

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



**A imunomodulação do pigmento malárico (hemozoína)  
aumenta a susceptibilidade para infecções bacterianas  
disseminadas?**

Márcia Carlos Rocha Boura

Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

**- 2012 –**

**A impressão desta dissertação foi aprovada pelo conselho científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa em reunião de 17 de Abril de 2012.**

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



**A imunomodulação do pigmento malárico (hemozoína)  
aumenta a susceptibilidade para infecções bacterianas  
disseminadas?**

Márcia Carlos Rocha Boura

Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

Dissertação orientada pelo Prof. Doutor Thomas Hänscheid

Todas as afirmações efectuadas no presente documento  
são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não  
cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de  
Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.



1. Carta de resposta a Dasari P, Reiss K, Lingelbach K, et al. **Digestive vacuoles of *Plasmodium falciparum* are selectively phagocytosed by and impair killing function of polymorphonuclear leukocytes.** *Blood*. 2011;118(18):4946-4956

## The issue if the phagocytosis of digestive vacuoles or hemozoin causes immune suppression may be more complex than presented

Thomas Hänscheid, Professor of Microbiology Márcia Boura, Ana Góis, Rosângela Frita

Instituto de Medicina Molecular & Instituto de Microbiologia, Faculdade de Medicina de Lisboa, Portu

In this report the authors claim that phagocytosis of the intact digestive vacuoles (DVs) rather than hemozoin (Hz) is ultimately responsible for increased susceptibility to bacterial infections in malaria. However, several aspects raise questions:

*In vivo*, Hz depositions in phagocytes tend to be variable in size and content. How can this be explained if each parasitized RBC only liberates one DV and if this DV is phagocytosed intact, as the authors imply? Yet, most parasites will digest similar amounts of haemoglobin and produce similar amounts of Hz, which would produce rather homogenous Hz deposits in phagocytes. Contrary to the authors we found that even protein-free and DNA-free synthetic Hz is phagocytosed by polymorphonuclear leukocytes (PMNs) (1), as well as purified native Hz (table). Interestingly and contrary to the reported observation, we saw repeatedly that several types of Hz crystals, including purified native Hz and synthetic Hz, show a tendency to aggregate, obviously in the absence of a DV. This led some investigators even to sonicate their Hz preparations before use (2).

| Type of Hemozoin | Concentration (micromolar) | Incubation Time (hours) | Depolarizing Granulocytes (%) |
|------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| <b>Synthetic</b> | 10                         | 4                       | 1.9                           |
|                  | 50                         | 4                       | 7.8                           |
| <b>Native</b>    | 50                         | 4                       | 29.7                          |

However, the most controversial point of this study is the rather unnatural overloading of PMNs with DVs (1:5). Hz-containing phagocytes observed in the field rarely, if ever, contain so many Hz-deposits as shown in the report. In fact, observations from the largest multicenter study on this subject showed that only a median of 1.0–2.5% of PMNs contained Hz in circulating blood and in 30%–84% patients had none at all (3). Even a more accurate flow cytometric method found HZ-containing PMNs only in 80% of uncomplicated malaria cases (4). Even if there was an accumulation of Hz-containing PMNs in some organs, there would still be massive numbers of Hz-free and thus unimpaired PMNs in circulation. Would those not be enough to fend of invading bacterial pathogens?

## References

1. Frita R, Rebelo M, Pamplona A et al. Simple flow cytometric detection of haemozoin containing leukocytes and erythrocytes for research on diagnosis, immunology and drug sensitivity testing. *Malar J.* 2011;10:74.
2. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med.* 2005;201(1):19–25.
3. Kremsner PG, Valim C, Missinou MA, et al. Prognostic value of circulating pigmented cells in African children with malaria. *J Infect Dis.* 2009;199(1):142–50.
4. Hanscheid T, Langin M, Lell B et al. Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. *Malar J.* 2008;7:109.

## 2. Prémio atribuído no âmbito da candidatura à apresentação dos resultados obtidos com este trabalho no 22º ECCMID.



**Administrative Secretariat**  
22nd ECCMID  
c/o Congrex Switzerland Ltd.  
Peter Merian-Strasse 80  
P.O. Box, 4002 Basel  
Switzerland  
Phone +41 61 686 77 11  
Fax +41 61 686 77 88  
E-mail [eccmid@congrex.com](mailto:eccmid@congrex.com)  
[www.escmid.org/eccmid2012](http://www.escmid.org/eccmid2012)

**Scientific Secretariat**  
22nd ECCMID  
c/o ESCMID Executive Office  
P.O. Box 214  
4010 Basel  
Switzerland  
Phone +41 61 508 01 50  
Fax +41 61 508 01 51  
E-mail [eccmid@escmid.org](mailto:eccmid@escmid.org)  
[www.escmid.org](http://www.escmid.org)

23 January 2012

ISF Sepsis Award & Symposium Speaker – 22nd ECCMID, 31 March-3 April 2012, London, UK

Dear Dr Marcia Boura,

We are very pleased to inform you that the ISF Steering Committee has chosen you to be this year's recipient of the **ISF/ESCMID Sepsis Award 2012 in recognition of outstanding abstract on a sepsis topic** for the 22nd ECCMID 2012. The award, which includes EUR 500, will be presented to you at the **22nd ECCMID in London, UK** by the ISF during the **Official Symposium: What's new in sepsis? on Tuesday, 3 April 2012 from 9.00-11.00 in the Platinum Suite 1/2**.

If you accept the award, which we are counting on, please provide us with a short summary of your research interests (maximum 150 words). It will be included in the announcement of your award, which will be published in the final programme of the **22nd ECCMID** as well as in selected other ESCMID publications. We would appreciate if you could **send this information together with a picture of yourself (passport format with print resolution) by 02 February 2012** to the Scientific Secretariat at [eccmid@escmid.org](mailto:eccmid@escmid.org). I hope the short deadline does not cause you any inconvenience.

Again, we are pleased to offer you this award as well as our congratulations. We are looking forward to your response and acceptance.

As part of this award, you are cordially invited to be a speaker at the 22nd ECCMID 2012 in London, UK. ECCMID has grown to now be the largest, most comprehensive and most influential congress in the infection field. Your 10-minute presentation is scheduled in the following 2-hour Symposium:

### What's new in sepsis?

Malaria predisposes to bacterial sepsis: is malaria pigment the key factor?

*Marcia Boura, Lisbon, PT*

"Smart" use of antibiotics in critical care

*Mervyn Singer, London, UK*

The SSC guidelines updated

*Thierry Calandra, Lausanne, CH*

Immunomodulation in sepsis – an update

*Steven M. Opal, Pawtucket, US*

Treating toxin-mediated sepsis

*Shiranee Sriskandan, London, UK*

The time allotted to your talk will be 10 minutes (including questions and answers). As in 2011, a selection of congress sessions will be audio-recorded for publication in the ESCMID Online Lecture Library ([www.escmid.org/OLL](http://www.escmid.org/OLL)). We will contact you for permission, if your session is selected.

London, United Kingdom  
31 March – 3 April 2012

EUROPEAN CONGRESS OF  
CLINICAL MICROBIOLOGY  
AND INFECTIOUS DISEASES

22nd **ECCMID**





## **Agradecimentos:**

Com o término de mais uma etapa académica quero deixar aqui expresso o meu agradecimento a várias pessoas e instituições que contribuíram para este trabalho.

Em primeiro lugar gostaria de expressar o meu agradecimento ao meu orientador Professor Doutor Thomas Hänscheid, por me ter acolhido no seu laboratório e sempre me acompanhar e orientar com toda a dedicação e empenho.

Ao Instituto de Medicina Molecular, em especial à Unidade de Microbiologia Molecular e Infecção pela disponibilização de instalações e equipamento. Gostaria também de agradecer ao Professor Doutor Melo-Cristino, por me ter acolhido na referida unidade.

Ao Instituto Português de Sangue por nos ceder tão gentil e prontamente os “*Buffy Coat*” necessários para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Cevayir Coban da Universidade de Osaka no Japão por nos enviar a hemozoína utilizada neste trabalho.

Ao Doutor Jaime Mota, do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa, por nos ceder a *Salmonella* GFP. Obrigada também pela prontidão e paciência com que me esclareceu todas as dúvidas.

À Unidade de Imunologia Clínica, em especial à Assistente de Investigação Alcinda Melo, pelo empréstimo do *Kit* Phagotest®. Obrigada pelo carinho e simpatia com que me ajudou.

Gostaria também de agradecer a todos os professores envolvidos na parte curricular deste mestrado, em especial à Professora Doutora Emília Valadas e ao Professor Doutor Francisco Antunes, pela dedicação com que dinamizaram e organizaram as aulas,

fazendo com que nunca perdessem o interesse e se adequassem às diferentes formações dos alunos. Obrigada duplamente à Professora Emília, pelo carinho e apoio que sempre me deu ao longo destes dois anos.

A todos os meus colegas de mestrado, em especial à Sara Brilha, por toda ajuda que me prestou, tanto do decorrer do meu trabalho, como pessoalmente. Obrigada por me fazeres desvalorizar o que não é importante e valorizar o que realmente é necessário.

A todo o pessoal da UMMI em particular à Sandra, às Joanas, à Catarina, ao Jorge e à Andreia pelo apoio e amizade demonstrado ao longo deste ano.

Às minhas colegas de laboratório Ana, Cláudia, Maria e Rosângela. Obrigada por tornarem os dias (e noites) de trabalho mais divertidos. Obrigada por me terem apoiado e ajudado sempre que precisei.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha família e amigos que foram tão importantes para o meu desenvolvimento pessoal. À Andreia, que me acompanhou em todo o meu percurso académico não só como colega, mas como grande amiga. À Su, por todas as maluqueiras que me ajudaram a manter a sanidade. À Catarina e ao Manel, por estarem sempre disponíveis. Ao meu primo David, por mesmo à distância, arranjar um tempinho para me apoiar. Obrigada mega gigante ao Renato, que me acarinhou e apoiou tanto em mais esta etapa, como em todas as outras. À minha mãe, pelo apoio, carinho, paciência e amizade com que me “aturou” nesta etapa. Obrigada por me fazeres ver que às vezes as coisas não são assim tão complicadas e impossíveis, se respirarmos fundo e as virmos com um sorriso.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN - Ácido ribonucleico

ATP – Adenosina trifosfato

CFU –*Colony forming units*

COX2 - Ciclo-oxigenase-2

CR –*Complement receptors*

DC –*Dendritic cells*

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EEA1 - *Early Endosome Antigen 1*

EUA – Estados Unidos da América

Fc – *Fragment crystallizable region*

FcR - *Fragment crystallizable region receptors*

FITC - *Fluorescein isothiocyanate*

FSC - *Forward Scatter*

GFP – *Green fluorescent protein*

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

4-HNE - *4-Hydroxynonenal*

HRP – *Histidine rich proteins*

Hz - Hemozoína

IMM – Instituto de Medicina Molecular

IPS – Instituto Português do Sangue

ITAM – *Immunoreceptors tyrosin-based activators motifs*

ITIM m – *Immunoreceptors tyrosin-based inhibition motifs*

LAMP – *Lysosomal-associated membrane protein*

LPS – Lipopolissacarídeo

MCM – *Malaria complete parasite medium*

MHC – *Major histocompatibility complex*

MHz – Meio de incubação de monócitos com hemozoína

NADPH - *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

nHz – Hemozoína Nativa

NTS – Non-Typhi Salmonella

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAMPS – *Pathogen-associated molecular patterns*

PBMC – *Peripheral blood mononuclear cell*

PBS – *Phosphate buffered saline*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PE - *Phycoerythrin*

PGE2 –Prostaglandina E2

pH –Potencial de Hidrogénio

PI – *Propidium iodide*

PKc – *Protein kinase c*

RBC –*Red Blood Cells*

RM – Receptores de Manose

RMP – Rotações por minuto

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium*

SDS – *Sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SEM - *Scanning electron microscope*

sHz – Hemozoína sintética

SSC- *Side Scatter*

TfR – Receptor da Transferrina

TiRBC – *Trophozoite infected red blood cells*

TLR – *Toll like receptor*

TNF $\alpha$  – *Tumor necrosis factor alpha*

V-ATPase – ATPase vacuolar

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida

## Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Resumo.....  | 1  |
| 1. Abstract .....   | 3  |
| 2. Introdução.....  | 5  |
| 2.1 Malária .....   | 5  |
| 2.1.1 Da antiguidade ao século XXI – Uma perspectiva histórica sobre a malária... | 5  |
| 2.1.2 Vector de transmissão .....   | 7  |
| 2.1.3 Ciclo de vida .....   | 7  |
| 2.1.4 Diagnóstico .....   | 10 |
| 2.2 Sépsis e malária .....  | 10 |
| 2.3 Fagocitose: mecanismos de ingestão e degradação.....                          | 13 |
| 2.3.1 Mecanismos de reconhecimento de partículas: formação do fagossoma .....     | 14 |
| 2.3.2 Maturação do fagossoma .....  | 17 |
| 2.3.3 Mecanismos microbianos de evasão à fagocitose.....                          | 19 |
| 2.3.4 Quantificação de fagocitose.....  | 21 |
| 2.4 Hemozoína .....   | 22 |
| 2.4.1 A imunomodulação do pigmento malárico .....                                 | 24 |
| 2.4.2 Diferentes cristais de hemozoína provocam diferentes efeitos? .....         | 27 |
| 2.5 Fundamentos básicos de citometria de fluxo .....                              | 29 |
| 2.5.1 Forward scatter e side scatter.....   | 29 |
| 2.5.2 Fluorescência .....   | 30 |
| 2.5.3 Principais componentes de um citómetro de fluxo .....                       | 31 |
| 2.5.4 Diferentes fluorocromos utilizados .....                                    | 31 |
| 2.5.5 Detecção do pigmento malárico por citometria de fluxo .....                 | 34 |
| 2.5.6 Equipamentos.....   | 34 |
| 3. Objectivos.....  | 36 |
| 4. Material e Métodos .....   | 37 |
| 4.1 Material de uso corrente em laboratório .....                                 | 37 |
| 4.2 Soluções e meios de cultura utilizados .....                                  | 37 |
| 4.3 Equipamento utilizado .....   | 41 |
| 4.3.1. Equipamento de uso corrente no laboratório .....                           | 41 |
| 4.3.2 Citómetro de fluxo .....  | 41 |
| 4.4 Obtenção e cultura das amostras celulares utilizadas .....                    | 42 |
| 4.4.1 Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i> .....                               | 42 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.4.2 | Microorganismos utilizados .....   | 43 |
| 4.4.3 | Células fagocitárias utilizadas e preparação .....   | 43 |
| 4.4.4 | Sangue total .....   | 45 |
| 4.5   | Optimização da opsonização de partículas .....   | 46 |
| 4.6   | Ingestão de hemozoína: Optimização da concentração e tempo de incubação utilizados.....          | 46 |
| 4.7   | Ensaio fagocítico .....  | 47 |
| 4.7.1 | Ensaio de inibição da fagocitose.....  | 48 |
| 4.8   | Influência da ingestão de hemozoína na capacidade fagocítica.....                                | 48 |
| 4.8.1 | Influência do meio de cultura de incubação de monócitos com hemozoína ..                         | 49 |
| 4.8.2 | Comparação dos ensaios fagocíticos utilizando as bio-partículas pHrodo™ e Phagotest™.....        | 49 |
| 4.9   | Ensaio com bactérias viáveis .....   | 50 |
| 4.9.1 | Optimização da incubação com gentamicina .....   | 50 |
| 4.9.2 | Influência da opsonização prévia da suspensão bacteriana .....                                   | 50 |
| 4.9.3 | Influência da Ingestão de hemozoína na capacidade fagocítica .....                               | 51 |
| 4.10  | Análise dos dados de citometria de fluxo .....   | 52 |
| 5.    | Resultados.....  | 55 |
| 5.1   | Hemozoína: análise quantitativa e qualitativa.....   | 55 |
| 5.2   | Optimização do isolamento de monócitos a partir de PBMCs .....                                   | 57 |
| 5.3   | Ingestão de hemozoína: optimização da concentração e tempo de incubação utilizados.....          | 58 |
| 5.4   | Ensaio fagocítico .....  | 60 |
| 5.4.1 | Optimização do ensaio fagocítico .....   | 60 |
| 5.4.2 | Ensaio de inibição da fagocitose.....  | 63 |
| 5.5   | Optimização das condições de opsonização .....   | 63 |
| 5.6   | Influência da ingestão de hemozoína na capacidade fagocítica.....                                | 65 |
| 5.6.1 | Comparação dos ensaios fagocíticos utilizando as bio-partículas pHrodo™ e Phagotest™.....        | 71 |
| 5.7   | Ensaio com bactérias viáveis .....   | 73 |
| 5.7.1 | Curva de crescimento de <i>Salmonella enterica</i> serótipo Typhimurium e expressão de GFP ..... | 73 |
| 5.7.2 | Optimização do tempo de incubação com gentamicina .....  | 74 |
| 5.7.3 | Opsonização de bactérias.....  | 75 |
| 5.7.4 | Ensaio fagocítico e bactericida .....  | 76 |

|   |     |
|---|-----|
| 6. Discussão.....   | 79  |
| 7. Conclusão .....  | 92  |
| 8. Bibliografia.....  | 93  |
| 9. Anexos.....  | 102 |
| Anexo i - Purificação de hemozoína nativa .....   | 102 |
| Anexo ii - Síntese de Hemozoína Sintética .....   | 103 |
| Anexo iii - Metodologia de avaliação da contaminação por bactérias do género <i>Mycoplasma</i> .....  | 104 |
| Anexo iv - Consentimento informado .....  | 105 |
| Anexo v – Preparação do meio completo de cultura de <i>Plasmodium falciparum</i> ....   | 107 |
| Anexo vi – Análise quantitativa e qualitativa e das diferentes hemozoínas utilizadas .....  | 108 |
| Anexo vii – Unidades formadoras de colónias de <i>Salmonella enterica</i> serótipo Typhimurium obtidas para cada tempo de incubação com hemozoína e respectivos controlos. .... | 110 |



## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp. ....   | 8  |
| Figura 2: Representação esquemática da formação e maturação do fagossoma .....   | 29 |
| Figura 3: Citómetro de fluxo CyFlow® SL. ....  | 35 |
| Figura 4 Fotografia e Esquema representativos da contagem absoluta volumétrica .....                                   | 54 |
| Figura 5 Estratégia de análise utilizada nos ensaios com monócitos purificados .....                                   | 53 |
| Figura 6: Imagens de microscopia electrónica obtidas para os diferentes tipos de hemozoína. ....                       | 68 |
| Figura 7: Taxa de recuperação de monócitos após a purificação por aderência .....                                      | 69 |
| Figura 8: Ingestão de diferentes concentrações de hemozoína por monócitos purificados .....                            | 70 |
| Figura 9: Ingestão de diferentes concentrações de hemozoína por monócitos e granulócitos (sangue total) .....          | 71 |
| Figura 10: Imagens representativas de microscopia óptica de monócitos que ingeriram ou não hemozoína. ....             | 71 |
| Figura 11: Percentagens de monócitos corados com iodeto de propídio (PI) .....   | 72 |
| Figura 12: Capacidade fagocítica de granulócitos .....   | 73 |
| Figura 13: Quantificação da capacidade fagocítica de monócitos aderentes ou em suspensão.....                          | 74 |
| Figura 14: Análise da capacidade fagocítica de granulócitos processados na presença e na ausência de EDTA.....         | 75 |
| Figura 15: Influência da opsonização das bio-partículas pHrodo™ na fagocitose .....                                    | 76 |
| Figura 16: Influência da opsonização na ingestão de hemozoína .....  | 76 |
| Figura 17: Capacidade fagocítica de monócitos pré-incubados com e sem hemozoína sintética .....                        | 78 |
| Figura 18: Capacidade fagocítica de monócitos e granulócitos (sangue total) pré-incubados com hemozoína .....          | 79 |
| Figura 19: Capacidade fagocítica de monócitos pré-incubados com e sem hemozoína sintética .....                        | 80 |
| Figura 20 Influência do meio de cultura na capacidade fagocítica de monócitos .....                                    | 82 |
| Figura 21: Comparação dos ensaios fagocíticos pHrodo™ e Phagoteste™ .....  | 84 |
| Figura 22 Efeito da hemozoína - comparação dos ensaios fagocíticos pHrodo™ e Phagoteste™ .....                         | 84 |
| Figura 23 Curva de crescimento de <i>Salmonella enterica</i> serótipo Typhimurium.. ....                               | 85 |
| Figura 24: Monitorização da fluorescência de <i>S. enterica</i> por citometria de fluxo.....                           | 86 |
| Figura 25: Influência da opsonização na capacidade fagocítica de monócitos. ....                                       | 88 |
| Figura 26: Capacidade fagocítica de monócitos incubados com e sem hemozoína sintética.....                             | 89 |
| Figura 27: Crescimento confluyente de bactérias <i>S. enterica</i> serótipo Typhimurium após o ensaio bactericida..... | 90 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 28: Cromatogramas de avaliação da contaminação das diferentes hemozoínas com heme. ....                 | 118 |
| Figura 29: Avaliação da contaminação com proteínas e ADN .....   | 119 |
| Figura 30: Avaliação de contaminação das diferentes hemozoínas com bactérias do género <i>Mycoplasma</i> ..... | 109 |

## Índice de Tabelas

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 1: Tipo e concentração das diferentes hemozoínas usadas .....  | 55  |
| Tabela 2: Diferenças entre a capacidade fagocítica de monócitos que ingeriram, ou não, hemozoína, em comparação com o controlo (não incubado com hemozoína).....              | 69  |
| Tabela 3: Diferenças entre a capacidade fagocítica de monócitos/granulócitos que ingeriram, ou não, hemozoína, em comparação com o controlo (não incubado com hemozoína. .... | 69  |
| Tabela 4: Quantificação da sobrevivência bacteriana após a incubação com gentamicina. ....  | 75  |
| Tabela 5 Constituintes das soluções utilizadas.....   | 104 |
| Tabela 6 Lista de reagentes utilizados na preparação de Albumax .....   | 107 |
| Tabela 7: Densidades ópticas e factores de diluição utilizados para determinar a concentração de hemozoína.....   | 108 |
| Tabela 8 Unidades formadoras de colónias de <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium ensaio bactericida com monócitos pré-incubados com ou sem hemozoína. ....         | 110 |



## 1. Resumo

**Introdução:** A infecção por *Plasmodium falciparum* é referida em diversos trabalhos, como um factor de risco para sépsis bacteriana, mais especificamente, por *Salmonella* não-typhi. Os fagócitos, monócitos e granulócitos, constituem a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos externos. Desta forma, caso este mecanismo se encontre comprometido pode levar à disseminação da infecção bacteriana, contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade. O pigmento malárico (hemozoína), um sub-produto do metabolismo do parasita, é libertado na corrente sanguínea após a lise eritrocítica e é ingerido pelos fagócitos, onde persiste por longos períodos.

**Objectivo:** Determinar se a hemozoína, ingerida por monócitos e granulócitos, tem alguma influência na função destas células, em particular na subsequente fagocitose e capacidade de eliminar bactérias (*Salmonella enterica* serótipo Typhimurium).

**Métodos:** Pré-incubaram-se monócitos e granulócitos, com diferentes concentrações de hemozoína. Após esta pré-incubação, acedeu-se à capacidade fagocítica, através da incubação com bio-partículas de *Escherichia coli*, conjugadas com um fluorocromo dependente do pH (pHrodo™). Estas bio-partículas apenas fluorescem em meio ácido como o encontrado em fagossomas, sendo assim possível detectá-las por citometria de fluxo. A capacidade fagocítica e bactericida de monócitos que ingeriram hemozoína foi avaliada através da utilização de bactérias viáveis, *Salmonella* GPF positiva.

**Resultados:** Os fagócitos pré-incubados com hemozoína, apresentam uma capacidade fagocítica comprometida relativamente aos controlos. Este efeito é dependente da dose de hemozoína utilizada e do tempo de incubação. A inibição da capacidade fagocítica não se cinge apenas aos fagócitos que ingeriram hemozoína. No ensaio fagocítico, com bactérias viáveis, não se verificou diferenças entre as capacidades fagocíticas de monócitos incubados com e sem hemozoína. No entanto, o ensaio bactericida revelou

que, os monócitos pré-incubados com hemozoína, permitiram uma maior sobrevivência bacteriana.

**Conclusão:** A hemozoína parece inibir a capacidade fagocítica de monócitos e de granulócitos. A capacidade de destruir bactérias parece estar, igualmente diminuída nos fagócitos incubados com hemozoína. Este facto pode explicar a predisposição dos doentes com malária para adquirirem infecções bacterianas disseminadas.

**Palavras-chave:** Hemozoína, fagocitose, sépsis

## 1. Abstract

Introduction: *Plasmodium falciparum* infection is referred, by several studies, as a risk factor for bacterial sepsis, especially with non-typhi *Salmonella*. Phagocytes (monocytes and granulocytes) are the first line of defense against external pathogens. If this mechanism is impaired it could lead to dissemination of bacterial infection contributing to increased morbidity and mortality. Malaria pigment (haemozoin), a sub-product of parasite's metabolism, released in the blood stream after erythrocytic lysis, is ingested by these cells, where it may persist.

Objective: To investigate if the hemozoin ingested by monocytes and granulocytes has some influence in their function in particular the subsequent phagocytosis and killing of bacteria (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium).

Methods: Monocytes and granulocytes were pre-incubated with different amounts of hemozoin. After this pre-incubation phagocytic capacity was assessed by incubation with a pH dependent dye conjugated with *Escherichia coli* particles (pHrodo™). These particles only fluoresce in acidic environment, such as found in phagosomes, which can be measured by flow cytometry. GFP transfected *Salmonella* were used to assess phagocytosis of live bacteria and killing of these bacteria in hemozoin containing phagocytes.

Results: Phagocytes pre-incubated with hemozoin have their phagocytic ability impaired relatively to the control. This effect is both dose and time dependent. The inhibition of phagocytic ability is not restricted only to phagocytes that ingested hemozoin. The phagocytic assay using viable bacteria revealed no differences between monocytes incubated with hemozoin and the respective controls. However, the bactericidal assay revealed higher bacterial survival in the hemozoin pre-incubated monocytes.

Conclusion: Hemozoin seems to impair the phagocytic capacity of phagocytes. Furthermore, phagocytes ability to kill bacteria seems decreased by hemozoin. This may explain why malaria patients acquire disseminated bacterial infections more easily.

**Key words:** Hemozoin, phagocytosis, sepsis

## **2. Introdução**

### **2.1 Malária**

#### 2.1.1 Da antiguidade ao século XXI – Uma perspectiva histórica sobre a malária

É aceite que o parasita causador de malária tenha aparecido em África, infectando os antepassados primatas do Homem tendo posteriormente evoluído e espalhado pelo mundo com ele <sup>1</sup>. As referências aos sinais e sintomas característicos da malária remontam à antiguidade. As primeiras descrições detalhadas foram feitas por Hipócrates, no século V a.C. Nesse período, a malária encontrava-se por toda a Europa e, por isso, as referências à doença tornavam-se cada vez mais comuns em toda a Grécia e Império Romano. Foi igualmente nesta altura que se entendeu que a transmissão de malária se encontrava associada a regiões pantanosas <sup>2</sup>. No entanto, só no século XIX com a ascensão da microbiologia, se começou a ver a malária numa perspectiva científica <sup>1</sup>. Na sua revisão sobre a história da parasitologia, Cox relata as principais descobertas, no âmbito da malariologia, desde a descoberta do agente causador de malária, em 1880, por Alphonse Laveran, um médico do exército francês. Este facto, valeu-lhe o prémio Nobel da Medicina em 1907. Posteriormente, em 1887, descobriu-se o vector de transmissão. Foi nesta altura que se entendeu que ciclo de vida do parasita passaria pelo mosquito. No entanto, só em 1947 foi descoberta a fase hepática do desenvolvimento do parasita, pondo fim à questão da inexistência de parasitas na corrente sanguínea nos primeiros dias após a picada do mosquito infectado. Desta forma, completou-se o entendimento do ciclo de vida do parasita.

Mais de 70 anos após o conhecimento do ciclo de vida do parasita, a malária ainda constitui um problema global de saúde pública <sup>3</sup>. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de metade da população mundial se encontre em risco de infecção, sendo os indivíduos que vivem nas zonas mais pobres do globo os mais



vulneráveis. E de facto, os últimos dados apontam para a ocorrência de 216 milhões de casos de malária em todo o mundo no ano de 2010, essencialmente concentrados no continente Africano (81%), Sudoeste Asiático (13%) e Mediterrâneo Oriental (5%). Estas regiões são fustigadas por um clima de instabilidade económica, social e política, o que dificulta as campanhas de prevenção e tratamento levadas a cabo pela OMS <sup>3</sup>.

No entanto, a OMS noticiou em Dezembro de 2011, que a taxa de mortalidade associada à malária tinha reduzido 25% desde 2000, sendo as maiores reduções verificadas no continente africano, onde se observou uma redução de 33%. Foi, igualmente, apontado que dos 99 países nos quais ocorre transmissão, 43 registaram uma diminuição de 50% no número de casos de malária no período compreendido entre 2000 e 2010<sup>3</sup>.

A OMS encara estes resultados como um sucesso das campanhas de prevenção e tratamento levadas a cabo nos países com transmissão de malária. No entanto, um estudo recente refere que apesar do declínio observado no início da década no número esfregaços positivos em crianças com síndrome febril, a partir de 2005 não se verifica uma redução significativa no número de admissões em hospitais por malária cerebral <sup>4</sup>. Numa análise sistemática da mortalidade por malária nas últimas duas décadas, os autores sugerem que, de facto, tenham ocorrido mais mortes relacionadas com malária do que o proposto pela OMS. Em crianças, com idades inferiores e superiores a cinco anos, os autores registaram uma mortalidade 1,3 e 8,1 vezes respectivamente, superior ao reportado pela OMS no último relatório. A mortalidade associada à malária em adultos, poderá ser substancialmente superior do que previsto pela OMS <sup>5</sup>.

A malária é causada por parasitas do género *Plasmodium*, mas apenas cinco espécies são capazes de infectar humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*,

*Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. Esta última espécie é de origem símia e descobriu-se, recentemente, ter ultrapassado a barreira da espécie <sup>6</sup>.

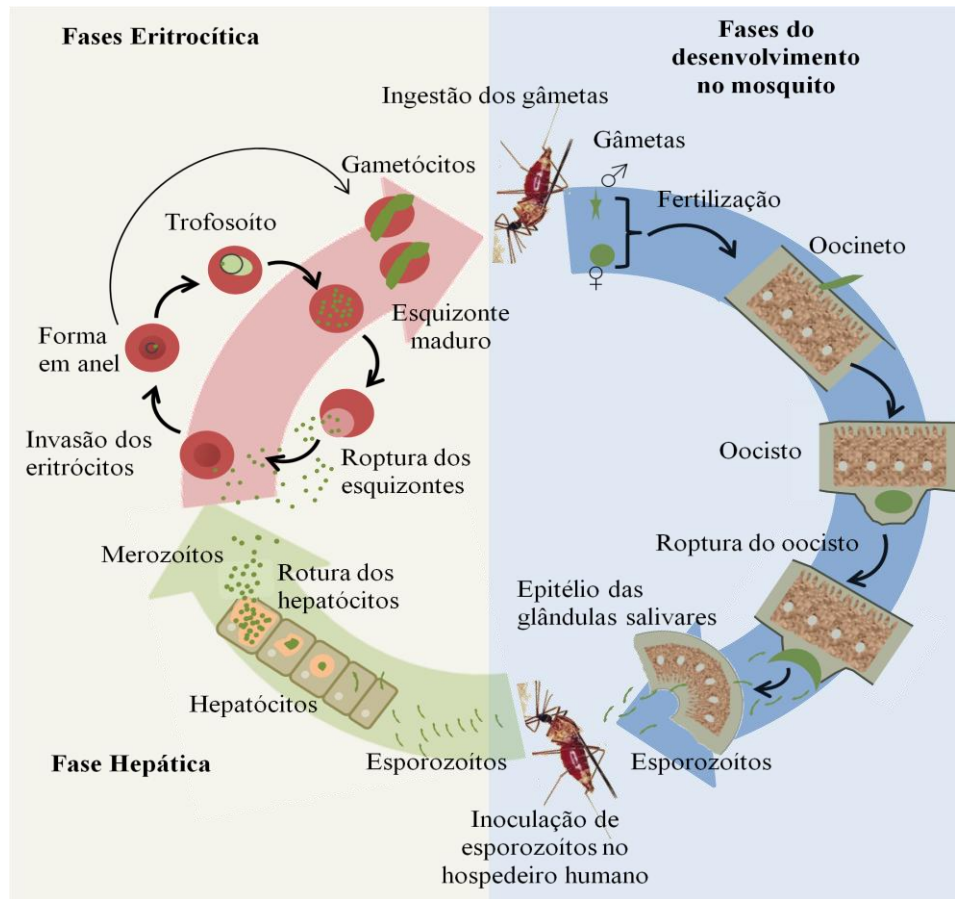
O ciclo de vida destes parasita é complexo envolvendo dois hospedeiros: o vector (mosquitos do género *Anopheles*) e o Homem <sup>7</sup>.

#### 2.1.2 Vector de transmissão

A malária é transmitida ao Homem através da picada de mosquitos fêmea do género *Anopheles*. São conhecidas cerca de 430 espécies de mosquitos do género *Anopheles*, espalhadas por todo o mundo, mas apenas cerca de 30-40 são passíveis de transmitir naturalmente malária a Humanos. Os mosquitos deste género são vectores de transmissão de várias doenças. No entanto, consoante a afinidade para o sangue humano, seja maior (antropofilia) ou menor (zoofilia), fazem com que determinadas espécies representem maiores riscos para a população <sup>8</sup>. Dois dos principais vectores de malária, *Anopheles gambiae* e *Anopheles funestus*, são, preferencialmente, antropofílicos. Estratégias de controlo da transmissão de malária devem passar pelo conhecimento adequado da biologia e do comportamento destes mosquitos. Factores como a susceptibilidade a insecticidas e locais de preferência estão a ser tidos em conta no desenho de estratégias de prevenção de malária <sup>9</sup>.

#### 2.1.3 Ciclo de vida

As cinco espécies de *Plasmodium* anteriormente referidas, têm ciclos de vida idênticos diferindo apenas em alguns pontos, que serão referidos posteriormente. A infecção inicia-se com a picada do mosquito. O mosquito injecta os esporozoítos na corrente sanguínea juntamente com a saliva. Os esporozoítos são transportados pela corrente sanguínea até ao fígado, onde invadem os hepatócitos. Aqui dá-se a fase hepática do ciclo, que consiste na produção de merozoítos por reprodução assexuada, que serão libertados para a corrente sanguínea (figura 1).



**Figura 1: Ciclo de vida de *Plasmodium* spp.** adaptado de <sup>10</sup>

As espécies *P. vivax* e *P. ovale* produzem uma forma parasitária (hipnozoítos) capaz de permanecer nos hepatócitos, durante longos períodos de tempo num estado de dormência. Os hipnozoítos podem ser reactivados numa janela temporal que vai desde algumas semanas após a infecção primária, mas que pode chegar a alguns anos. As infecções causadas pela maturação de hipnozoítos são denominadas de recaídas.

Os merozoítos libertados do fígado para a corrente sanguínea infectam os eritrócitos, dando início à fase eritrocítica do ciclo de vida. Aqui, o parasita utiliza os recursos do eritrócito para aumentar o seu tamanho, originando o trofozoíto. De forma a ganhar espaço no interior da célula, o parasita digere hemoglobina através da clivagem proteolítica das ligações peptídicas. Juntamente com aminoácidos, são libertados os

grupos prostéticos da hemoglobina – heme. O heme é altamente tóxico, tanto para o parasita como para o hospedeiro. Através de um processo de bio-cristalização, o heme livre é convertido em hemozoína, também conhecida como pigmento malárico.

A maturação do trofozoíto culmina com a divisão nuclear e formação do esquizonte. A rotura do esquizonte maduro leva à libertação dos merozoítos na corrente sanguínea, capazes de infectar novos eritrócitos, dando origem a um novo ciclo eritrocítico.

A fase eritrocítica do ciclo é a responsável pela patologia associada à malária. Os períodos intermitentes de febre observados nos doentes com malária, correspondem à lise dos eritrócitos infectados. É aqui que reside a principal diferença entre as espécies de *Plasmodium*: *P. malarie* tem uma periodicidade de 72 horas, enquanto as restantes espécies apresentam um ciclo eritrocítico com uma duração de 48 horas. No entanto, a infecção por *P. falciparum* pode apresentar períodos contínuos de febre em vez dos picos característicos de malária.

Em alternativa, a continuar com o ciclo replicativo, o parasita pode-se diferenciar nas formas sexuais, gametócitos. Quando o hospedeiro é novamente picado pelo mosquito, estes gametócitos, no interior do mosquito, induzem a formação de gâmetas. Os microgâmetas são formados a partir de um processo denominado de exflagelação. Possuem um flagelo que lhes permite fertilizar o macrogameta, originando o zigoto. O zigoto desenvolve-se numa forma móvel, o oocineto que, por sua vez, se desenvolve no oocisto no interior das células epiteliais do intestino do mosquito. O oocisto replica-se, assexuadamente, repetidamente. Deste processo resulta a produção de esporozoítos, que são libertados após a rotura do oocisto maduro, indo migrar para as glândulas salivares do mosquito. O parasita está assim preparado para infectar um novo hospedeiro <sup>7</sup>.

#### 2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico de malária é feito a partir da observação microscópica de amostras sanguíneas, tanto em gota fina (esfregaços) como em gota espessa. Este é, também o método preferencial para identificar a espécie responsável pela infecção. A utilização de uma gota espessa é um método de concentrar a amostra e é utilizado, essencialmente, com o objectivo de detectar a presença de microrganismos. Um técnico experiente também pode utilizar esta metodologia, com o objectivo de identificar a espécie, no entanto, é muito mais usual a utilização de um esfregaço de sangue para este fim. As amostras sanguíneas podem conter formas parasitárias correspondentes a qualquer estágio da evolução, pelo que, a melhor altura para a colheita do sangue a analisar será entre os acessos de febre e calafrios, altura em que se regista um aumento do número de organismos intracelulares. A observação microscópica dos esfregaços sanguíneos deverá ser cuidadosa, já que podem existir infecções mistas, com combinações das espécies de *Plasmodium* (sendo, as mais comuns, *P. falciparum* e *P. vivax*). A detecção de uma infecção mista terá uma influência directa na selecção do tratamento adequado<sup>7</sup>.

#### **2.2 Sépsis e malária**

Juntamente com a malária, as infecções bacterianas invasivas constituem as principais causas de morbilidade e mortalidade infantil no continente Africano<sup>11,12</sup>. O seu diagnóstico representa um pesado fardo para as debilitadas economias dos países afectados, tanto a nível de infra-estruturas como de pessoal especializado<sup>13,14</sup>. Diversos estudos demonstram que, a existência de bacteriémia em crianças internadas em hospitais africanos é relativamente comum, tanto em zonas com alta prevalência de malária como em zonas com baixa prevalência<sup>15,16</sup>. O agente bacteriológico mais usual é a *Salmonella enterica*. Entre os serótipos não-Typhi – NTS destaca-se a *Salmonella enterica* serótipo Typhimurium como agente importante. Numa meta-análise sistemática

publicada recentemente, onde se analisaram estudos previamente publicados, nos quais se havia realizado hemoculturas, apontou a *Salmonella enterica* como o agente bacteriano mais frequente <sup>13</sup>. Nesse estudo, a *Salmonella enterica* foi responsável por 29,1% dos casos analisados, sendo 58,4% NTS. Em contraste com o que se observa em países desenvolvidos, nos quais, as infecções com NTS causam predominantemente gastroenterite associada a baixa mortalidade <sup>17</sup>, no meio rural e urbano de África subsariana, em que a grande maioria da população se encontra imunitariamente debilitada (essencialmente devido a malnutrição e elevadas prevalências de outros agentes infecciosos como plasmódio e VIH <sup>14</sup>), as infecções por NTS são invasivas e causam uma mortalidade infantil que, em determinados países, chega a superar a taxa de mortalidade infantil associada à malária. De facto, crê-se que os valores de mortalidade infantil atribuídos a infecções NTS disseminadas, sejam ainda superior ao registado, uma vez que, no ambiente rural africano o óbito de muitas crianças ocorre fora do hospital <sup>11,18</sup>.

Existem diversos factores de risco para a disseminação de infecção causada por NTS, nomeadamente factores ambientais, uma vez que estas infecções se encontram associadas às estações chuvosas. No entanto, os factores relacionados com o hospedeiro são os mais preponderantes. A par da idade do indivíduo, a malnutrição, a anemia e as infecções por VIH ou malária, são considerados factores de predisposição para a disseminação destas infecções <sup>14</sup>.

Nos últimos anos, surgiram diversas evidências para uma clara associação entre as duas patologias. Na Gâmbia foi reportado um decréscimo da incidência de infecções disseminadas causadas por NTS, em paralelo com o declínio de malária, resultante do sucesso das campanhas de prevenção e tratamento. Por si só, este facto não corrobora a hipótese de associação entre malária e NTS invasiva. No entanto, os autores referem

que outros factores podem ter influenciado o declínio observado nas duas patologias, nomeadamente uma melhoria das condições ambientais e socioeconómicas do país. É interessante notar que, a análise da incidência de outros agentes causadores de bacteriémia (pneumococos), no mesmo período de tempo, não revelou as mesmas alterações verificadas em infecções por NTS <sup>19</sup>.

Mas não só a anemia causada por malária é apontada como um factor de risco para a disseminação de infecções bacterianas. Uma vez que a anemia falciforme também é considerada um factor de predisposição para ocorrência de NTS disseminadas, sugeriu-se que a ruptura eritrocitária, resultante do ciclo de vida do parasita, fosse a responsável pela associação entre as duas patologias <sup>20</sup>. De facto, estudos utilizando o modelo murino, nos quais se induziu a lise eritrocitária através de anti-corpos e, posteriormente, se infectou os animais com *S.typhimurium*, demonstraram que a doença afectava mais rapidamente estes animais, originando-lhes a morte<sup>21</sup>. No entanto, um estudo mais recente compara os efeitos da anemia mediada por anti-corpos com a anemia causada pela infecção por malária, na predisposição para a disseminação de NTS <sup>22</sup>. Os autores observaram que, de facto a anemia predispõe à disseminação de NTS. No entanto, no caso da hemólise causada pela infecção por *P. yoelii*, provoca uma predisposição 100 vezes superior relativamente ao observado na hemólise mediada por anti-corpos. Esta observação pode significar que a hemólise resultante da malária não será o único factor de risco/ predisposição para a aquisição de NTS disseminada, mas sim, múltiplos factores específicos da infecção por plasmódio, sejam responsáveis por um sistema imunitário deficiente, proporcionando a disseminação da infecção por NTS. Os mesmos autores observaram a existência de macrófagos contendo pigmento malárico (hemozoína), no baço dos ratinhos usados como modelo de co-infecção <sup>22</sup>.

Os mecanismos moleculares subjacentes a esta associação, não são totalmente conhecidos. Parece claro que a anemia causada por malária, por si só, não é responsável por esta predisposição. No entanto, no decorrer da lise eritrocítica, a hemozoína é libertada na corrente sanguínea. A sua acumulação no interior de macrófagos e neutrófilos pode comprometer as suas funções bactericidas, proporcionando a disseminação da infecção. Foi também proposto que o aumento do ferro disponível, resultante da saturação de metaloproteínas férricas, favorecesse o desenvolvimento bacteriano devido ao carácter siderofílico de NTS <sup>14</sup>.

### **2.3 Fagocitose: mecanismos de ingestão e degradação**

A fagocitose é o processo de inclusão de partículas sólidas pelo fagócito através de emissão de pseudópodos. Em mamíferos, a fagocitose é essencialmente levada a cabo por granulócitos, monócitos e macrófagos, geralmente denominados fagócitos profissionais. Os monócitos e granulócitos surgem a partir de precursores da medula óssea, durante a hematopoiese. Enquanto os granulócitos se encontram na fase final da sua diferenciação, sendo mantidos em circulação apenas durante um a dois dias, os monócitos, geralmente diferenciam-se em macrófagos <sup>23</sup>. Dependendo do tecido onde se encontrem e das funções a desempenhar, os macrófagos podem manter-se por longos períodos de tempo, que podem eventualmente chegar a alguns anos. Os fagócitos profissionais têm um carácter de “vigilantes”: circulam pela corrente sanguínea e pelos tecidos e são rapidamente recrutados para locais onde ocorra uma lesão, infecção, ou inflamação <sup>24</sup>. Apresentam uma grande versatilidade, ingerindo desde células apoptóticas, senescentes, partículas exógenas, como por exemplo, microrganismos invasores. A capacidade de fagocitar este leque tão vasto de partículas é atribuída à expressão de diversos receptores de membrana especializados, como descrito no ponto 2.3.1 na página 14.



A fagocitose pode ser dividida em duas fases distintas: a formação e a maturação do fagossoma. A formação do fagossoma consiste no reconhecimento e inclusão da partícula na célula fagocítica, enquanto a maturação corresponde ao desenvolvimento do fagossoma, permitindo-lhe degradar a partícula ingerida <sup>25</sup>. O processo de maturação, não só ajuda a suprimir a infecção, como vai gerar antígenos que vão ser apresentados à superfície da célula através da associação ao receptor MHC (do inglês, *major histocompatibility complex*), com o propósito de activar a imunidade adaptativa <sup>26</sup>.

A fagocitose tem um papel crucial na defesa do organismo contra agentes infecciosos externos. Assim, caso este mecanismo se encontre, de alguma forma comprometido, pode proporcionar a evasão de bactérias ao sistema imunitário e a consequente proliferação, originando a disseminação da infecção <sup>27,28</sup>.

#### 2.3.1 Mecanismos de reconhecimento de partículas: formação do fagossoma

A fagocitose em mamíferos é um processo de eliminação de microrganismos ou de outras partículas, consideradas estranhas ao organismo. Os fagócitos profissionais ingerem as partículas grandes através de mecanismos complexos, que envolvem uma grande variedade de processos biológicos. O processo de reconhecimento dessas partículas exógenas e a sua posterior ingestão é mediado por múltiplos receptores com mecanismos moleculares distintos. Estes receptores são capazes de induzir diferentes vias de sinalização, que, muitas vezes, interagem entre si. O reconhecimento de bactérias está associado a respostas inflamatórias, que, por sua vez, vão condicionar a eficiência da ingestão dos restantes fagócitos. Os receptores presentes na membrana dos fagócitos profissionais, associados à ingestão de bactérias, melhor caracterizados, são os receptores Fc, os receptores do complemento e os receptores de manose <sup>29-31</sup>.

### 2.3.1.1 Fagocitose mediada por receptores Fc

Os receptores Fc (do inglês, *fragment crystallizable region receptors*) são assim denominados por se ligarem a regiões Fc de imunoglobolinas G (IgG), com maior ou menor afinidade. Dos receptores envolvidos nas vias de sinalização de fagocitose, os receptores Fc (FcR) são os que se encontram mais bem descritos. Grande parte do conhecimento actual sobre estas vias é devido aos FcR <sup>32</sup>. Os FcγR podem dividir-se em duas classes, conforme activem ou inibam a sinalização. Os receptores ITAM (do inglês, *immunoreceptors tyrosine-based activation motifs*) contêm uma sequência específica de aminoácidos, que lhes permite recrutar proteínas cinases que activam cascatas de fosforilação <sup>33</sup>. Por sua vez, os receptores que contenham no seu domínio intercelular, sequências de aminoácidos capazes de recrutar fosfatases, têm uma influência inibitória na sinalização. Estes receptores são denominados ITIM (do inglês, *immunoreceptors tyrosine-based inhibition motifs*) <sup>30,32</sup>.

Os FcγR reconhecem partículas opsonizadas com IgG. A inclusão da partícula é desencadeada através do recrutamento de membrana ao local de contacto e da polimerização de actina, por baixo da partícula. Estes processos vão permitir a emissão de pseudópodes, que vão envolver a partícula. Este processo é estritamente regulado pelos receptores ITAM e ITIM. A sua expressão relativa à superfície da célula determina a eficiência com que a partícula vai ser ingerida <sup>33</sup>.

### 2.3.1.2 Fagocitose mediada por receptores do complemento

As bactérias são opsonizadas por proteínas do complemento existentes no soro, num processo que pode, ou não, ser mediado por anti-corpos. Diversos receptores do complemento (CR, do inglês, *complement receptors*) estão envolvidos na fagocitose, nomeadamente CR1, CR3 e CR4, que se encontram expressos em monócitos e granulócitos <sup>34</sup>.

Estruturalmente, o CR1 é composto por uma cadeia trans-membranar com um longo domínio extracelular (onde ocorre a ligação) e por um domínio citosólico constituído por apenas 43 aminoácidos <sup>35,36</sup>. O CR1 liga-se a um vasto leque de opsoninas, no entanto, por si só não é capaz de mediar a ingestão, estando essencialmente envolvido na ligação da partícula a fagocitar. A ligação das opsoninas ao CR1 parece aumentar a resposta fagocítica mediada pelos receptores Fc <sup>37</sup>.

O CR3 e o CR4 pertencem à família das integrinas e são heterodímeros constituídos por uma cadeia  $\alpha$  (CD11b no caso do CR3 e CD11c no caso do CR4) e uma cadeia  $\beta$  comum aos dois receptores (CD18) <sup>35,36</sup>. Estes receptores são responsáveis pela ingestão da partícula, sendo no entanto, necessária a presença de estímulos adicionais. Estes estímulos podem ser a ligação a substratos revestidos com laminina ou fibronectina, activadores da proteína cinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*) ou TNF- $\alpha$  <sup>29,38,39</sup>.

#### 2.3.1.3 Fagocitose mediada pelo receptor de manose

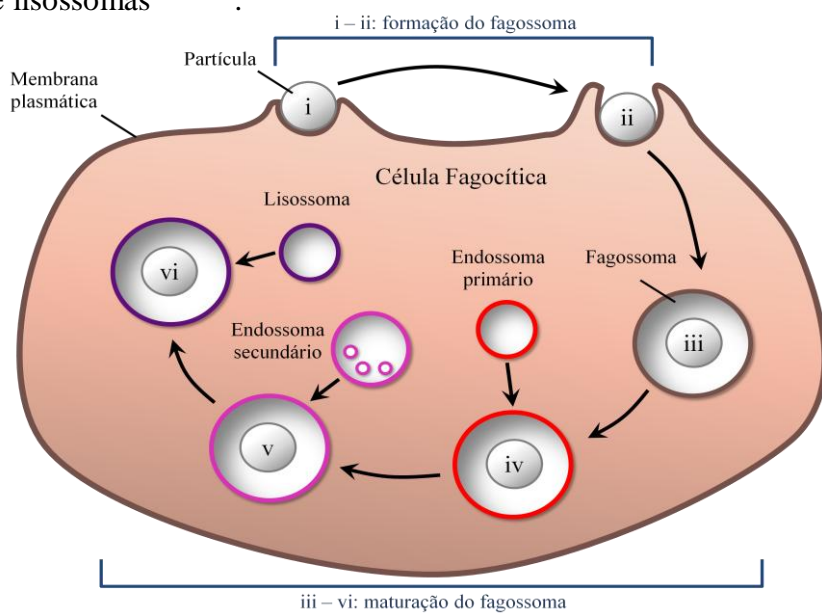
O receptor de manose (RM) é constituído por cadeia única com um domínio citoplasmático e um domínio extracelular análogo de lectina 8. O seu domínio citoplasmático desempenha um papel crucial nas funções fagocíticas do receptor, no entanto, pouco se sabe sobre as vias de sinalização em que se encontra envolvido <sup>40</sup>.

O RM pertence à família de PAMPs (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*), ou seja, reconhece padrões específicos apresentados à superfície dos microrganismos. No caso do RM esses padrões são a manose e a fucose. Este facto permite-lhe reconhecer uma vasta gama de microrganismos <sup>41</sup>.

Juntamente com a sinalização que estimula a ingestão da partícula, a ligação da manose/fucose ao RM desencadeia uma sinalização pró-inflamatória, sendo produzido IL-11 $\beta$ , IL-6, GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IL-12 <sup>42-44</sup>.

### 2.3.2 Maturação do fagossoma

A maturação do fagossoma (representado na Figura 2) é normalmente abordada como um processo de acidificação que leva à degradação da partícula ingerida. Os mecanismos moleculares envolvidos na maturação do fagossoma não estão totalmente esclarecidos, devido à grande complexidade dos processos que a constituem. O modelo de maturação mais aceite actualmente, propõe a interacção do fagossoma com as vias endocíticas e lisossómicas através de uma série de fusões e fissões que permitem uma transferência selectiva do conteúdo das duas vesículas <sup>45</sup>. Na elegante revisão sobre a temática, Vieira e colaboradores esclarecem que, imediatamente após a ingestão da partícula, o fagossoma não apresenta as características funções bactericidas. Estas propriedades só são adquiridas através da interacção sequencial, com as vesículas de endossomas e lisossomas <sup>31,45,46</sup>.



**Figura 2: Representação esquemática da formação e maturação do fagossoma.** Adaptado de <sup>25</sup>.

Pouco depois da ingestão, o fagossoma tem uma afinidade preferencial para se fundir com endossomas primários. A análise da composição membranar de fagossomas, com menos de 30 minutos, revelou a existência de componentes característicos da membrana citoplasmática, mas também certos marcadores de endossomas primários, como

receptores de transferrina (TfR, do inglês *transferrin receptors*), EEA1 (do inglês, *early endosome antigen 1*) e Rab5. No entanto, nesta fase da maturação não se encontram marcadores característicos de endossomas secundários ou de lisossomas <sup>25,45</sup>. As proteínas características da membrana citoplasmática e de endossomas primários são gradualmente eliminadas do fagossoma. Verifica-se a existência de um tráfego proteico retrógrado, do fagossoma para a membrana da célula, tal como observado no desenvolvimento da via endossômica. Trinta minutos após a ingestão da partícula, o fagossoma funde-se preferencialmente com endossomas secundários. Desta forma, o fagossoma adquire as componentes membranares de endossomas secundários, como Rab7, Rab9 e receptor de manose-6-fosfato <sup>47</sup>.

A fusão com lisossomas é o passo final da maturação do fagossoma. Desta fusão resulta uma diminuição no pH (índice de acidez de uma substância). A diminuição do pH, ou seja, a acidificação do fagossoma é um processo contínuo ao longo da maturação, principalmente, devido à contínua acumulação de V-ATPases (ATPase vacuolar). Esta proteína promove a entrada de prótons no fagossoma (íons  $H^+$ ), utilizando a energia proveniente da hidrólise de ATP <sup>48</sup>. A acidificação é uma componente essencial da maturação do fagossoma. Este processo é considerado um marcador de funcionalidade do fagossoma, uma vez que, a degradação da partícula ingerida será levada a cabo por hidrolases, que só se encontram activas a pH baixos. A acidificação do fagossoma desempenha um papel preponderante na apresentação de antígenos, uma vez que através da acção de proteases são gerados pequenos péptidos que são apresentados à superfície da membrana, ligados a moléculas MHC. O complexo MHC II-péptido irá migrar para a membrana celular, onde emite um sinal para o recrutamento de células-T. Além disso, a catépsina D, uma enzima proteolítica que se encontra funcional a pH ácido, activa as proteínas do MHC II <sup>46</sup>. A apresentação de antígenos é uma

componente essencial do desenvolvimento de uma resposta imunitária capaz, uma vez que, o recrutamento da imunidade adquirida é dependente deste processo<sup>23,26</sup>.

Durante todo o processo de maturação, o fagossoma não é um organelo passivo, pelo contrário promove a sinalização necessária para desencadear a fusão com os diferentes elementos da via endocítica e lisossômica<sup>45</sup>. A fusão de fagossomas com endossomas e posteriormente com lisossomas, não é encarada como uma fusão completa dos dois organelos, mas antes, como uma fusão momentânea que permite a troca selectiva de componentes fluídicas e membranares<sup>31</sup>.

### 2.3.3 Mecanismos microbianos de evasão à fagocitose

Muitas bactérias desenvolveram estratégias para se evadirem ao sistema imunitário do hospedeiro. Diferentes microrganismos desenvolveram diferentes mecanismos de evasão aos fagócitos, o que lhes permite sobreviver e proliferar no interior do organismo do hospedeiro. Essas estratégias podem ir desde a camuflagem, evitando a detecção por parte dos fagócitos e a consequente ingestão, ou podem promover a regular ingestão, tomando partido do ambiente do fagócito para se desenvolverem. Uma outra forma de evasão ao sistema imunitário é a inibição da maturação do fagossoma, impedindo-o de adquirir as propriedades bactericidas que permitiriam a eliminação do microrganismo invasor. A vasta diversidade que se verifica nas estratégias de evasão reflecte a complexidade do processo fagocítico<sup>30</sup>. Diversos microrganismos são capazes de estabelecer as estratégias anteriormente mencionadas, como forma de escapar à degradação levada a cabo no fagossoma. Entre eles encontram-se bactérias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Legionella pneumophila*<sup>29-31</sup>. Uma vez que neste trabalho se utilizou *S. enterica* serótipo Typhimurium, como modelo de fagocitose, é pertinente fazer uma breve revisão dos mecanismos que esta bactéria utiliza como forma de sobreviver e proliferar no interior de fagócitos profissionais.

*Salmonella* é um patogéneo intracelular facultativo, capaz de se replicar no interior de fagócitos profissionais. A entrada na célula é mediada por FcγR, envolvendo o rearranjo do cito-esqueleto através da polimerização de actina <sup>49</sup>. A partir deste processo é formado um fagossoma de grandes dimensões, relativamente à bactéria. Este fagossoma é idêntico aos compartimentos celulares obtidos por pinocitose <sup>50</sup>. No entanto, não se observou a formação deste fagossoma, de grandes dimensões, quando se utilizou um mutante não virulento <sup>51</sup>.

A ingestão de *Salmonella* provoca mudanças nas vias de sinalização da célula hospedeira o que afecta diversos processos vitais, como o tráfego membranar, a divisão celular, a acção bactericida e a apresentação de antigénios <sup>49</sup>.

O destino da *Salmonella* é determinado por múltiplos factores, tanto do hospedeiro como da bactéria <sup>49</sup>. Isto pode explicar o facto de diversos grupos de investigação proporem diferentes destinos para o fagossoma de grandes dimensões contendo *Salmonella*. Alguns grupos sugeriram que ocorresse a maturação do fagossoma, uma vez que observaram a aquisição de marcadores lisossómicos, como LAMP-1 (do inglês *Lysosomal-associated membrane protein 1*) e catepsina L <sup>52,53</sup>. Pelo contrário, outros sugerem que o fagossoma não se funde com lisossomas, permanecendo imaturo <sup>54</sup>.

A interacção da *Salmonella* com o organismo hospedeiro envolve vários factores de virulência, sendo que os mais importantes são os sistemas de secreção 1 e 2 do tipo III (T3SS1 e T3SS2, do inglês, *type III secretion systems 1 and 2*). A rápida acidificação do fagossoma contendo *Salmonella*, parece ser essencial à sua sobrevivência intracelular. De facto, os factores de virulência anteriormente mencionados são activados a pH ácido <sup>30</sup>. Estes factores de virulência são usados para injectar no citoplasma das células hospedeiras cerca de 30 proteínas efectoras, que actuam em diferentes vias de sinalização <sup>55</sup>. Interferem, por exemplo, no tráfego proteico de NADPH oxidase (do

inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*). Esta proteína é importante para o fagócito conseguir eliminar a bactéria uma vez que gera espécies reactivas de oxigénio <sup>56</sup>.

#### 2.3.4 Quantificação de fagocitose

A fagocitose representa uma componente essencial da imunidade. Desta forma a determinação da correcta funcionalidade de fagócitos profissionais surge com grande interesse, quer no diagnóstico de patologias do sistema imunitário, quer na investigação da acção de patogéneos sobre a imunidade inata. Para se determinar se os fagócitos em questão se encontram nas suas plenas capacidades, isto é, de ingerir partículas e de activar toda a maquinaria necessária à sua degradação, foram desenvolvidos ensaios de dois tipos. Os ensaios fagocíticos quantificam a capacidade de os fagócitos profissionais ingerirem partículas e os ensaios bactericidas de as digerir e eliminar. Com os avanços nos campos da citometria de fluxo e da microscopia de fluorescência, desenvolveram-se diversos ensaios com partículas bacterianas marcadas com fluorocromos, que permitem a sua detecção após a ingestão <sup>57-59</sup>. Estes ensaios são mais usados através de testes comerciais como o phagotest ® e, mais recentemente, pHrodo™ <sup>60-63</sup>.

No entanto, a crescente utilização de microrganismos geneticamente modificados, proporcionou a construção de mutantes que expressem proteínas fluorescentes, como a proteína verde fluorescente GFP (do inglês, *green fluorescent protein*). Estes ensaios são vantajosos relativamente aos ensaios com partículas bacterianas marcadas com fluorocromos, uma vez que permitem a utilização de bactérias viáveis <sup>57,64</sup>. A utilização de bactérias viáveis permite reproduzir *in vitro* com mais exactidão os mecanismos desencadeados pela ingestão das bactérias. Além disso, permite analisar em paralelo, a fagocitose e a capacidade bactericida. Os ensaios que visam quantificar a capacidade bactericida centram-se na viabilidade bacteriana após a ingestão por fagócitos



profissionais <sup>64-66</sup>. O conceito de viabilidade bacteriana é, nestes ensaios, exclusivamente associado à capacidade das bactérias se replicarem em cultura. Na interpretação destes ensaios dever-se-á ter em conta que uma bactéria, capaz de se replicar, pode no entanto, ter outras funções afectadas, que no meio hostil como o organismo do hospedeiro, a impedissem de proliferar.

## **2.4 Hemozoína**

Os parasitas do género *Plasmodium*, no decorrer do seu ciclo de vida, mais especificamente, na fase intra-eritrocítica, digerem a hemoglobina. A hemoglobina é uma metaloproteína férrica responsável pelo transporte do oxigénio até aos tecidos. O transporte é possível devido à presença de um grupo prostético, o heme, que contém um átomo central de ferro ao qual o oxigénio se liga. Cada molécula de hemoglobina possui quatro grupos heme. Após a digestão da hemoglobina, o heme é libertado. O heme livre (ou ferro protoporfirina IX) é altamente tóxico, quer para o parasita, quer para o hospedeiro, essencialmente devido à oxidação do ferro ao estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), com a formação de espécies reactivas de oxigénio <sup>67</sup>. De forma a remover o heme livre, o parasita promove a formação do pigmento malárico ou hemozoína. A hemozoína é um cristal prismático com uma característica cor escura. Na elegante revisão de 2007, Hänscheid e seus colegas <sup>68</sup> descrevem um pouco da história do pigmento malárico. A pigmentação escura encontrada em órgãos de doentes com malária severa foi observada em 1717 por Lancisi, ainda antes da identificação do parasita. Mais tarde, em 1847, Meckel descreveu uma autópsia na qual observou a existência de uma pigmentação escura no sangue e em órgãos internos. No entanto, Meckel não conseguiu estabelecer uma conexão com a malária. Em 1849, Virchow conseguiu estabelecer a ligação entre o pigmento e a malária <sup>68</sup>. Este facto permitiu a identificação do pigmento malárico, sem se saber, no entanto, como era formado ou qual a sua constituição <sup>69</sup>. Actualmente sabe-

-se que a hemozoína é um cristal constituído por dímeros de heme. Os dímeros são formados através de ligações ferro-carboxilato a cada uma das cadeias laterais da porfirina. Os dímeros interagem através de pontes de hidrogénio <sup>70</sup>. No entanto, o processo exacto pelo qual o parasita converte o heme em hemozoína não está totalmente esclarecido. O envolvimento de proteínas ricas em histidina (HRP, do inglês, *histidine-rich proteins*) foi posto de parte, uma vez que em *P. vivax* não são encontradas estas proteínas, no entanto, este parasita é capaz de produzir hemozoína. Um outro indício de que o processo de bio-cristalização da hemozoína não é mediado por HRP é o facto de clones de *P. falciparum* silenciados para a expressão de HRP serem capazes de produzir hemozoína <sup>71</sup>. Recentemente, a hipótese de uma catálise lipídica tem ganho força. Estudos de microscopia electrónica de transmissão detectaram a presença de cristais de hemozoína em nano esferas lipídicas <sup>72</sup>. Um outro facto que suporta esta teoria, é o facto da síntese de hemozoína *in vitro* ser promovida pela presença de monoacilglicerois insaturados. No entanto, o mesmo não se verifica para diacilglicerois e triacilglicerois insaturados <sup>73</sup>.

No decorrer do desenvolvimento do parasita no interior dos eritrócitos, mais de 80 % da hemoglobina é degradada e o heme libertado é convertido em hemozoína <sup>74</sup>. Quando o eritrócito infectado lisa, de forma a libertar os merozoítos para um novo ciclo de infecção, a hemozoína é igualmente libertada. A hemozoína é rapidamente ingerida pelos fagócitos presentes em circulação, onde persiste durante longos períodos de tempo, sem ser digerida. Um estudo demonstrou que monócitos e neutrófilos que fagocitaram hemozoína permaneciam em circulação por 216 e 72 horas, respectivamente (valores de medianas) <sup>75,76</sup>.

A presença de hemozoína, em leucócitos, demonstrou ser um indicador da severidade da doença, como relatado no artigo de revisão de Hänscheid e seus colaboradores <sup>68</sup>. De

facto, um estudo aponta a hemozoína como capaz de prever a progressão da doença de uma forma mais eficaz que a parasitémia <sup>77</sup>.

#### 2.4.1 A imunomodulação do pigmento malárico

Apesar da hemozoína ter sido considerada um cristal inerte <sup>78</sup>, os efeitos da prolongada permanência em monócitos e granulócitos levantam dúvidas sobre qual o seu papel na imunopatologia associada à malária. De facto, nas últimas duas décadas surgem diversos estudos sobre um possível carácter imunomodulador da hemozoína, como discutido em diversos artigos de revisão <sup>68,74</sup>. A ideia de que a hemozoína fosse a responsável pela inibição na função de monócitos surge, através da observação de uma redução na capacidade bactericida e anti-tumoral, destas células, após a incubação com eritrócitos infectados com trofozoítos (TiRBC) <sup>79</sup>. Esta forma parasitária contém grandes quantidades de hemozoína.

O mesmo grupo observou a formação de lipoperóxidos em macrófagos que ingeriram hemozoína <sup>80</sup>. Estudos mais recentes apontam para o facto de que a hemozoína, no interior de macrófagos, aumentasse a secreção de moléculas, tal como a 4-hidroxinonenal (4-HNE) <sup>81</sup>. Esta molécula é um aldeído terminal da peroxidação de lípidos, produzida através da actividade catalítica do ferro presente na hemozoína <sup>81</sup>. Os autores propõem que a molécula tenha um efeito inibitório na eritropoiese, através de um mecanismo que envolva alterações profundas no ciclo celular (retardamento da apoptose e alterações na transição da fase G1 para a fase S) <sup>81</sup>. Um outro indício do envolvimento da hemozoína na subsistência da anemia na malária surge num estudo com crianças hospitalizadas com infecção por *P. falciparum*, demonstrando que a percentagem de monócitos com hemozoína era inversamente co-relacionável com o hematócrito <sup>82</sup>.

A produção de hidroxi-ácidos gordos polinsaturados, através da interacção da hemozoína com a membrana, provoca a sua peroxidação <sup>83</sup>. Além disso, estes hidroxi-ácidos gordos polinsaturados são ainda responsáveis pela inibição de funções de monócitos, como a capacidade fagocitar partículas, de activar citocinas inflamatórias e gerar uma correcta resposta oxidativa <sup>84,85</sup>.

De facto, Schwarzer e colaboradores, identificaram alterações significativas na expressão de antígenos, à superfície de monócitos que tinham ingerido hemozoína. O estudo demonstrou que monócitos com hemozoína eram incapazes de induzir MHC II em resposta a estimulação por interferão-gama (INF- $\gamma$ ). O INF-  $\gamma$  regula positivamente o MHC II, facto que não se verifica em monócitos incubados com hemozoína. A apresentação de antígenos à superfície das células fagocíticas é um factor preponderante para o recrutamento de células-T. A ineficácia de INF-  $\gamma$  em gerar uma resposta por parte de MHC II compromete a resposta imunitária mediada por células-T. O mesmo estudo identifica uma possível inibição de moléculas como CD54 e CD11c, ambas importantes para o funcionamento de inibição mediada por células-T <sup>85</sup>.

Outros trabalhos dos mesmos autores, identificam uma incapacidade de monócitos com hemozoína se diferenciarem em células dendríticas (DC, do inglês *dendritic cells*). A hemozoína aparenta igualmente ter um efeito inibitório no desenvolvimento de células dendríticas inflamatórias, uma vez que, as DC que ingeriram hemozoína, exibem uma maturação comprometida em resposta à estimulação por lipopolissacarídeos (LPS) ou por ligandos de proteínas de superfície (como o ligando de CD40) <sup>86 87</sup>. A inibição da maturação de células-T no decorrer de infecções, especialmente em fases tardias, tem consequências graves para o desencadeamento da imunidade adaptativa. Os autores concluem que as DC são capazes de activar células-T mas que estas são incapazes de proliferar e segregar citocinas. Estas células-T são incapazes de migrar para os folículos

onde são necessárias para ajudar as células-B. Desta forma, falta igualmente uma resposta mediada por anticorpos específicos <sup>87</sup>.

Foi também detectada uma produção reduzida de ciclo-oxigenase 2 (COX2) e prostaglandina E2 (PGE2) em crianças com malária <sup>88</sup>. A razão desta observação foi atribuída à hemozoína e parece contribuir para a malária cerebral e manutenção da anemia.

É conhecido o envolvimento de receptores do tipo *toll* (TLR, do inglês, *toll like receptors*) no reconhecimento de constituintes de *P. falciparum*. Coban *et al.* propuseram que a hemozoína activasse DC, através do reconhecimento específico de TLR9. Este facto iria promover a activação da resposta imune resultante da produção de moléculas pró-inflamatórias, o que foi observado *in vitro* e *in vivo* <sup>89</sup>. Num outro estudo, os mesmos autores sugerem que seja possível tirar partido da activação de DC, provocada pela interacção da hemozoína com TLR9, utilizando a hemozoína como adjuvante para uma vacina contra a malária <sup>90</sup>.

No entanto, surgem outros estudos que indicam que a hemozoína, por si só, é inerte, mas que o facto de a hemozoína proveniente do parasita (hemozoína nativa) se encontrar possivelmente contaminada com ADN proporcione a sua interacção com TLR <sup>91</sup>. Esta hipótese foi rebatida pela utilização de  $\beta$ -hematina, o análogo sintético da hemozoína nativa. Vários grupos demonstraram que esta hemozoína sintética não estava contaminada com ADN e, no entanto, apresentava propriedades imunogénicas <sup>89,92</sup>.

No entanto, outros autores afirmam que a hemozoína não terá quaisquer capacidades imunomodulatórias. Atribuem a activação de DC mediada por TLR a um complexo proteína-ADN específico da fase eritrocítica de *P. falciparum* e não à hemozoína ou à hemozoína associada a ADN <sup>93</sup>.

Também um estudo que se centra na inibição de DC, no decorrer da infecção por *P. falciparum*, descarta a hemozoína como possível responsável. Os autores afirmam que eritrócitos infectados, mas não a hemozoína, são capazes de inibir a maturação de DC e o consequente recrutamento de células-T<sup>94</sup>.

#### 2.4.2 Diferentes cristais de hemozoína provocam diferentes efeitos?

O processo de isolamento da hemozoína nativa envolve a manutenção de culturas de *Plasmodium*, processo, por si só, delicado. Quando se acresce os passos de purificação necessários para isolar a hemozoína nativa, deparamo-nos com uma metodologia complexa e morosa. Este facto levou diversos grupos de investigação a utilizar um análogo sintético, a  $\beta$ -hematina ou hemozoína sintética<sup>90,95-97</sup>. A hemozoína sintética é idêntica à hemozoína nativa, quer espectroscopicamente, quer no padrão obtido por difracção de raios-X<sup>70</sup>. No entanto, uma análise morfológica, por microscopia electrónica de varrimento (SEM, do inglês *scanning electron microscope*) mostrou que diferentes metodologias de produção de  $\beta$ -hematina apresentavam diferentes características morfológicas e cristalinas<sup>92</sup>. Os autores caracterizam os cristais obtidos por uma cristalização rápida e por uma cristalização lenta.

Na metodologia de cristalização lenta a  $\beta$ -hematina é sintetizada através do envolvimento de uma base anidra (*acid-catalyzed hematin anhydride*). Este é um processo moroso, chegando a demorar entre duas semanas a 15 meses<sup>92</sup>. Além disso, a necessidade de ser realizada numa atmosfera inerte, dificulta a utilização desta metodologia em estudos correntes de biologia<sup>74</sup>. Esta metodologia produz cristais morfológicamente idênticos aos de hemozoína nativa. Apesar da forma e cristalinidade destes cristais serem idênticas a  $\beta$ -hematina apresenta dimensões superiores à hemozoína nativa. Os cristais de  $\beta$ -hematina têm cerca de 4 $\mu$ m enquanto os cristais de hemozoína nativa têm entre 0,5 e 1,0  $\mu$ m<sup>92</sup>.

A metodologia de produção de hemozoína sintética através de cristalização rápida é realizada por catálise ácida (*anhydrous base-annealing hematin anhydride*). Esta metodologia, desenvolvida por Slater <sup>69</sup>, permite a obtenção de cristais homólogos de boa qualidade. O tamanho dos cristais varia entre os 0,8 e 1,0  $\mu\text{m}$ , tal como se verifica para os cristais de hemozoína nativa. Um controlo rigoroso das condições de síntese (como a temperatura da reacção) proporciona a obtenção, de forma reprodutível, de material cristalino morfológica e dimensionalmente idêntico à hemozoína nativa. A catálise ácida de  $\beta$ -hematina é o processo de produção de hemozoína sintética mais utilizado, uma vez que é possível produzir cristais idênticos aos de hemozoína nativa, num curto espaço de tempo. Além disso, os reagentes utilizados no processo de síntese estão facilmente acessíveis em qualquer laboratório de biologia <sup>69,92</sup>.

Além das evidentes diferenças morfológicas e dimensionais entre as metodologias de produção de hemozoína sintética, os autores sugerem que diferentes efeitos imunológicos estejam associados às diferentes características físico-químicas dos cristais <sup>92</sup>. De facto, a importância do tamanho dos cristais de hemozoína utilizados nos estudos imunológicos é evidenciado pelos diferentes resultados no estudo de hemozoína como possível adjuvante, realizado por Coban. Cristais mais pequenos (entre 0,01 e 0,2  $\mu\text{m}$ ) demonstraram ter um efeito adjuvante óptimo, enquanto os cristais de maior dimensão (2,0 a 60,0  $\mu\text{m}$ ) possuem um efeito adjuvante muito reduzido <sup>90</sup>. As dimensões dos cristais de hemozoína que apresentaram um efeito adjuvante mais evidente são relacionáveis com as dimensões dos cristais de hemozoína nativa e sintética (produzida através de catálise ácida). Da mesma forma, a hemozoína sintética obtida pela metodologia de cristalização lenta (pela utilização de uma base anidra) apresenta dimensões compatíveis com a obtenção de um reduzido efeito adjuvante (cerca de 4  $\mu\text{m}$  por cristal).

Um estudo recente afirma que, apesar da hemozoína nativa e da  $\beta$ -hematina serem estruturalmente idênticas à hemozoína nativa, aquando da libertação do eritrócito encontra-se envolta pelo vacúolo digestivo do parasita. Os autores sugerem que a este vacúolo contendo hemozoína, e não apenas a hemozoína, seria fagocitado por granulócitos e responsável pelos efeitos imunológicos usualmente atribuídos à hemozoína<sup>98</sup>.

Estas evidências permitem reflectir sobre os resultados discrepantes acerca do efeito de hemozoína no sistema imunitário. Uma uniformização das condições de síntese, no caso da utilização de hemozoína sintética, e das condições de purificação, no caso de hemozoína nativa, são preponderantes para uma noção de qual o real efeito imunológico de hemozoína. A comparação dos trabalhos de diferentes grupos é, igualmente, dificultada por esses factores.

## **2.5 Fundamentos básicos de citometria de fluxo**

### **2.5.1 Forward scatter e side scatter**

A citometria de fluxo é um método analítico que permite analisar características físicas da célula. Este método possibilita a análise de diversos parâmetros numa forma qualitativa e quantitativa.

A amostra, geralmente uma suspensão celular, é injectada no instrumento e atravessa a câmara de fluxo a uma velocidade constante e perpendicularmente ao feixe de radiação proveniente do laser. De forma a possibilitar a análise de cada célula existente na amostra, a passagem pelo laser é feita, partícula a partícula, através de um processo denominado de focagem hidrodinâmica. A focagem hidrodinâmica do fluxo é conseguida através do envolvimento da amostra por um meio líquido, *sheath*, aquando da injeção no instrumento. Cada partícula, ao passar através do laser, provoca uma



dispersão da luz, característica das suas propriedades físicas. Esta dispersão é recolhida por detectores sendo os dados processados informaticamente.

A luz dispersa em ângulos pequenos é condicionada pelo tamanho da célula, mas depende também de outros factores, tais como o índice de refração. É designada por *forward scatter* ou FSC. A luz dispersa pela célula em ângulos maiores, representa a complexidade celular aumentando com a rugosidade da superfície da célula e com o número de organelos presentes no seu interior. É designada por *side scatter* ou SSC. O tamanho e a complexidade celular são considerados parâmetros intrínsecos da célula e permitem distinguir diferentes tipos de células (por exemplo, monócitos de granulócitos) <sup>99</sup>.

#### 2.5.2 Fluorescência

A par do FSC e do SSC, característicos de uma dada população de células, os corantes fluorescentes constituem uma ferramenta adicional para o estudo dessa população. Podem actuar de diversas maneiras, como por exemplo, intercalados ou ligados a diferentes componentes celulares (ADN, ARN, proteínas), ou conjugados a anticorpos específicos para ligação a proteínas nas membranas ou no interior das células, entre outras.

Quando as células marcadas atravessam um feixe de luz, os electrões das moléculas fluorescentes são excitados para um estado energético mais elevado e instável. Ao reverter para o nível energético mais baixo, os electrões libertam energia sob a forma de fótons. Uma vez que a luz fluorescente emitida é inferior à luz absorvida, o comprimento de onda da luz fluorescente é mais elevado (e por isso menos energético) que a luz incidente. A esta diferença, entre os comprimentos de onda de emissão e absorção, chama-se desvio de *Stokes*. A luz fluorescente emitida é detectada por tubos fotomultiplicadores.

### 2.5.3 Principais componentes de um citómetro de fluxo

Um citómetro de fluxo convencional é constituído pelo sistema hidráulico, óptico, electrónico, de iluminação e componente de análise de dados. O sistema hidráulico é constituído pelo *sheath* e é o responsável pela focagem hidrodinâmica da célula. O sistema de iluminação é responsável pelo feixe de luz (geralmente um laser) que incide sobre cada célula isolada e que origina os sinais de FSC, SSC e fluorescência. O sistema óptico, que recolhe a luz dispersa e a fluorescência emitida pelas células em todas as direcções. Este sistema direcciona a luz para uma série de filtros e espelhos dicróicos, que permitem a passagem de luz de comprimentos de onda específicos. Os sinais luminosos são detectados por fotodetectores e por tubos fotomultiplicadores. O sistema electrónico é responsável pela transformação dos sinais luminosos em pulsos eléctricos (analógicos). As magnitudes destes pulsos são distribuídas, electronicamente, para canais, sendo depois representados histogramas com o número de células para cada parâmetro (FSC, SSC e fluorescências). O sistema de análise de dados consiste num *software* para análise de toda a informação produzida. Este *software* permite o estudo e a análise independente de sub-populações de células específicas<sup>99,100</sup>.

### 2.5.4 Diferentes fluorocromos utilizados

#### 2.5.4.1 Bio-partículas pHrodo™

Utilizaram-se bio-partículas provenientes de *Escherichia coli* conjugadas com pHrodo™, como forma de quantificar a capacidade fagocítica de monócitos e granulócitos. O pHrodo™ é uma molécula capaz de aumentar a sua fluorescência à medida que o pH envolvente baixa. A sua forma succinimidil-éster-amino reactiva tem um pKa de cerca de 7,3 que se altera para cerca de 6,5 quando a molécula é conjugada com as bio-partículas bacterianas. Desta forma, é possível quantificar a capacidade fagocítica com base na acidificação do fagossoma. Este método proporciona a obtenção

de resultados altamente específicos, uma vez que, as bio-partículas só apresentam fluorescência no interior de fagossoma devidamente acidificado. Adicionalmente, previne a existência de sinal de *background* resultante de bio-partículas não ingeridas que se possam encontrar no meio extracelular ou agarradas à membrana citoplasmática. As bio-partículas pHrodo™ apresentam um comprimento de onda de absorção ótimo de 560 nm, sendo no entanto, facilmente excitadas com os lasers de argon (488 nm) instalados na maioria dos citômetros de fluxo. O seu comprimento de onda máximo de emissão (fluorescência) é 585 nm. Convenientemente, a intensidade da fluorescência varia com o pH, sendo tanto mais intensa quando mais baixo (ácido) for o pH do meio (pHrodo™ protocolo, 2010)<sup>101</sup>.

#### 2.5.4.2 Iodeto de propídeo

O iodeto de propídeo (PI) é um corante de fluorescência vermelha. Este corante liga-se ao ADN, intercalando-se entre os nucleotídeos, com pouca ou nenhuma preferência na sequência, e com uma estequiometria de uma molécula de PI para 4-5 pares de bases de ADN. Quando ligado, e dado o ambiente hidrofóbico em que se encontra, emite uma fluorescência mais intensa do que quando isolado. Esta molécula possui carga negativa o que a impede de penetrar através de membranas celulares intactas. No entanto, uma vez no interior da célula, a carga negativa fornece-lhe uma forte afinidade para ácidos nucleicos. Tomando partido destas propriedades, é possível utilizar o PI como indicador da inviabilidade celular através da identificação de células que apresentem a membrana comprometida.

O comprimento de onda de absorção e de emissão máxima desta molécula intercalada com ADN é 535 nm e 617 nm, respectivamente <sup>99</sup>.

#### 2.5.4.3 Anti-CD14 conjugado com isotiocianato de fluoresceína ou ficoeritrina

O isotiocianato de fluoresceína (FITC) e a ficoeritrina (PE) têm amplas aplicações no campo da citometria de fluxo, como por exemplo, a sua conjugação com anticorpos.

O FITC é um derivado da fluoresceína e tem um comprimento de onda de absorção e emissão de 495nm e 521nm, respectivamente.

O PE é uma proteína vermelha encontrada em cianobactérias e algas vermelhas. O seu comprimento de onda de absorção e emissão é 495 nm e 545/566 nm, respectivamente<sup>99</sup>.

#### 2.5.4.4 *Salmonella enterica* serótipo Typhimurium GFP positiva

Desde que foi descoberto o gene que codifica a proteína verde fluorescente, GFP (do inglês, *green fluorescent protein*), em medusas *Aequorea victoria*, que se entendeu que a sua utilização, como marcador fluorescente, teria as mais variadas aplicações na área da biotecnologia.

A absorção da radiação ocorre no hexapéptido localizado entre os resíduos 64 e 69 da proteína, sendo portanto uma característica intrínseca desta. A GFP apresenta uma emissão máxima a 509 nm que lhe confere a característica fluorescência verde<sup>102</sup>.

Uma das principais vantagens da GFP é a possibilidade de permitir que se analisem células vivas e se proceda à sua monitorização em tempo real. Através de técnicas de engenharia genética a incorporação de GFP no ADN de bactérias (pela introdução de um plasmídeo que expresse construtivamente GFP) possibilitou o desenvolvimento de um ensaio fagocítico utilizando bactérias viáveis<sup>64,103</sup>.

As bactérias fluorescentes, no interior dos fagócitos, são facilmente detectáveis por citometria de fluxo. As bactérias não ingeridas são eliminadas através da realização do ensaio sob a protecção de gentamicina. A gentamicina provoca a morte das bactérias

extracelulares, impedindo a existência de um sinal de fluorescência que poderia condicionar os resultados obtidos.

#### 2.5.5 Detecção do pigmento malárico por citometria de fluxo

A hemozoína é um cristal birrefringente, ou seja, é capaz de desviar um plano de luz polarizada. Desta forma, a presença de hemozoína no interior de monócitos, granulócitos ou eritrócitos parasitados, pode ser detectada por citometria de fluxo <sup>104</sup>. Esta propriedade óptica permite a sua detecção através da medição da dispersão da luz polarizada. Este parâmetro de citometria foi incluído em contadores hematológicos (Cell-Dyn<sup>®</sup>, Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, EUA), utilizados em laboratórios de rotina, como forma de distinguir eosinófilos dos restantes granulócitos <sup>105,106</sup>. A detecção de eosinófilos é possível porque os seus grânulos característicos provocam a depolarização da luz. Só se entendeu a utilidade que estes contadores hematológicos teriam no diagnóstico de malária quando, mais tarde, se analisaram amostras sanguíneas de doentes e surgiu uma população anormal que depolarizava a luz de forma semelhante aos eosinófilos. Esta população correspondia a monócitos e granulócitos que tinham fagocitado hemozoína <sup>106-108</sup>.

#### 2.5.6 Equipamentos

Os avanços na citometria de fluxo permitiram o desenvolvimento de equipamentos modernos com grande precisão e que permitem a detecção de um grande número de parâmetros. No entanto, estes equipamentos são muito pesados e de grandes dimensões. Em alternativa, surgem equipamentos mais compactos e mais simples, cuja eficácia não fica no entanto comprometida, como é o caso do CyFlow<sup>®</sup> SL (Partec, Münster, Alemanha). O CyFlow<sup>®</sup> SL (Figura 3) permite a análise de diferentes parâmetros ópticos (até cinco), podendo ainda ser utilizado na contagem absoluta de células, sem recorrer à utilização de esferas de referência como meio de calibração. É um

instrumento com uma elevada precisão devido à utilização de um laser azul (488nm) em estado sólido, caracterizado por um tempo de vida significativamente mais longo comparativamente aos lasers utilizados nos outros citómetros, que necessitam de arrefecimento. É um aparelho portátil, de 32Kg, que tem uma manutenção simples e apresenta a possibilidade de funcionar ligado à bateria de um automóvel. Estas características são vantajosas, especialmente quando comparadas com as de outros equipamentos mais pesados e volumosos, principalmente quando é necessário proceder a análises em laboratórios onde o espaço disponível é limitado ou no caso de se pretender utilizar o equipamento em trabalhos de campo. O aparelho é fornecido com *software* de análise de dados da Partec, FloMax®. Este *software*, que funciona com o sistema operativo Microsoft Windows™, permite controlar o aparelho, adquirir e analisar os dados<sup>109</sup>.



**Figura 3: Citómetro de fluxo CyFlow® SL.**

### **3. Objectivos**

O principal objectivo deste trabalho é averiguar se a hemozoína é o factor preponderante da infecção por plasmódio que contribui para a susceptibilidade a infecções bacterianas disseminadas verificada em doentes com malária.

Neste sentido pretende-se:

1. Estudar se a função bactericida dos fagócitos é, ou não, afectada pela presença de hemozoína.
2. Investigar se a presença da hemozoína diminui a capacidade de fagocitose de bactérias (*Salmonella enterica*, serótipo Typhimurium).

## **4. Material e Métodos**

### **4.1 Material de uso corrente em laboratório**

O material de vidro utilizado neste trabalho consistiu em tubos de vidro de 10 mL com tampa de rosca, frascos de pirex “Schott” de 500 mL e 1 L e provetas graduadas de 500 mL. O material descartável utilizado neste trabalho consistiu em microtubos de polipropileno de 1,5mL (Eppendorf, Madrid, Espanha), pipetas graduadas de 2, 5, 10 e 25 mL (Corning Lowell, MA, EUA), tubos de fundo cónico graduados de 15 e 50 mL (Corning Lowell, MA, EUA), placas de petri com diâmetro de 60 mm (TPP Trasadingen, Suíça), placas de 24 poços com 1,86 cm<sup>2</sup> de área do poço (TPP Trasadingen, Suíça), filtros de celulose de 33 mm de diâmetro com poros de 0,22 µm (Millex-GP, Millipore, Billerica, MA, EUA), *Steritop* e *Stericup* de 250 mL (Millex-GP, Millipore, Billerica, MA, EUA), frascos de cultura celular *Easy Flask* de 25 e 75 cm<sup>2</sup> de área de crescimento (Thermo Fisher Scientific, Surrey, Reino Unido) pontas para pipetas de 1-10 µL, 20-200 µL e 200-1000 µL (Greiner Bio-One, Famões, Odivelas, Portugal), e tubos de citometria de 3,5 mL (Sarstedt, Rio de Mouro, Portugal). Foram utilizadas micropipetas (Labnet Biopette, Edison NJ, EUA) com gamas entre 200-1000 µL, 50-200 µL, 10-100 µL, 2-20 µL e 0,2-2 µL.

### **4.2 Soluções e meios de cultura utilizados**

Consoante o fim a que se destinava, foram utilizados três tipos de água: água de qualidade do tipo II, colhida directamente do sistema Millipore Elix 10 UV (Millipore, Billerica, MA, EUA), e água de qualidade do tipo I, colhida através do sistema Milli-Q Synthesis (Millipore, Billerica, MA, EUA), de 0,054 Ω de resistividade e com um filtro de 0,22 µm e água ultra pura (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Gibco, Invitrogen, Madrid, Espanha).



O meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, Invitrogen, Madrid, Espanha) sem L-glutamina foi utilizado em todos os passos de incubação das células fagocitárias.

O meio RPMI-1640 suplementado com L-glutamina 200 mM (Sigma, Sintra, Portugal), 12,5 mL de HEPES 1 M (Gibco, Invitrogen, Madrid, Espanha), gentamicina (100 mg/mL) (Gibco, Invitrogen, Madrid, Espanha) e Albumax 10x foi utilizado na cultura de *Plasmodium falciparum*. O protocolo de preparação de Albumax 10x a partir AlbuMAX II® (Gibco, Invitrogen, Madrid, Espanha) encontra-se descrito em anexo v.

O meio *Luria-Bertani* - LB *Broth* e LB agar (Lenox) (Pronadisa, Madrid, Espanha) foram preparados dissolvendo 20 g e 35 g respectivamente em água tipo II e posteriormente autoclavados.

A solução *stock* de ampicilina (Sigma, Sintra, Portugal) foi preparada a uma concentração de 100.000 µg/mL. A solução foi filtrada com um filtro de 0,22 µm. A ampicilina foi incorporada no meio LB (*Broth* e agar) numa concentração final de 100 µg/mL.

O tampão PBS 1x (do inglês *Phosphate Buffered Saline*) foi feito a partir de uma diluição de 1:10 de PBS 10x (Gibco, Invitrogen, Madrid, Espanha).

O Tampão de Lise de eritrócitos, composto por 4,13 g de NH<sub>4</sub>Cl (cloreto de amónio), 0,59 g de KHCO<sub>3</sub> (bicarbonato de potássio) e 0,00185 g de EDTA (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*) dissolvidos em 500 mL de água destilada. O tampão é posteriormente autoclavado e guardado à temperatura ambiente até 6 meses após a sua preparação. Todos os componentes deste tampão são da Sigma Aldrich (Sintra, Portugal).

O iodeto de propídeo (PI, do inglês *propidium iodide*) (Molecular Probes, Invitrogen, Madrid, Espanha) foi preparado a uma concentração de 20 mM em água ultra pura (Gibco, Invitrogen, Madrid, Espanha), filtrado com um filtro de 0,22 µm e guardado a 4

°C, protegido da luz. Como solução de trabalho utilizou-se PI a 100 µg/mL. Os ensaios com PI realizaram-se adicionando 5 µL da solução de trabalho à suspensão celular, incubados no gelo durante 20 minutos, protegido da luz.

As *beads* de látex (Latex Beads, polystyrene – 0,1 µm, Sigma, Sintra, Portugal) foram utilizadas a partir de uma solução *stock* a 10%, preparada em água ultra pura. Nos ensaios descritos utilizou-se as *beads* de látex a 0,1%.

O anti-CD14 conjugado com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e com o fluorocromo ficoeritrina (PE do inglês *Phycoerythrin*) (Immunotools, Friesoythe – Alemanha), guardado a 4 °C protegido da luz. A marcação com anti-CD14-FITC e anti-CD14-PE realizou-se através da adição de 5 µL de anticorpo à suspensão celular e incubou-se durante 20 minutos, no gelo, protegido da luz.

O ensaio comercial pHrodo™ *E. coli* BioParticles® Phagocytosis Kit para citometria de fluxo (Molecular Probes, Invitrogen, Madrid, Espanha) é constituído por um tampão de lise (solução A), um tampão de reconstituição (solução B), um tampão de lavagem (solução C) e pelas bio-partículas liofilizadas. As bio-partículas foram preparadas em 2 mL solução B do mesmo conjunto de reagentes (pHrodo™ *E. coli* BioParticles®) e guardadas até 6 meses após a preparação a 4 °C e protegido da luz. Os ensaios com este reagente foram realizados através da adição do reagente à suspensão celular (numa razão de 20 partículas por fagócito) e incubação a 37 °C ou 4 °C durante o tempo indicado para cada ensaio.

As bio-partículas opsonizadas Phagotest™ *E.coli*-FITC (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemanha) foram guardadas a 4 °C e protegidas da luz. Os ensaios com este reagente foram realizados através da sua adição à suspensão celular (numa razão de 20 partículas por fagócito) e incubação a 37 °C ou 4 °C durante o tempo indicado para cada ensaio.

A hemozoína nativa foi obtida a partir de culturas in-vitro de *Plasmodium falciparum* (estirpe 3D7). A metodologia detalhada de purificação da hemozoína nativa encontra-se no anexo i.

A hemozoína sintética utilizada foi gentilmente cedida pela Professora Doutora Cevayir Coban (Osaka University, Japão). Em alguns ensaios foi utilizada como comparação a hemozoína sintética produzida na equipe de trabalho (pela aluna de Mestrado Ana Góis). As hemozoínas sintéticas utilizadas foram sintetizadas pelo método de Slater, com algumas modificações. A descrição da metodologia detalhada de síntese de hemozoína encontra-se descrita no anexo ii.

Antes de qualquer utilização a hemozoína foi quantificada através de um ensaio colorimétrico, QuantiChrom Heme Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward CA, EUA), segundo as indicações do fabricante. Anteriormente à utilização do ensaio de quantificação a hemozoína foi dissolvida nas suas unidades básicas (heme), sendo que o valor determinado representa a concentração equivalente de heme. A dissolução do cristal foi feita por hidrólise básica com NaOH (12 mM) (sigma, Sintra, Portugal) durante 1 hora, para garantir que toda a hemozoína foi convertida em heme. O ensaio baseia-se na conversão do heme numa solução com cor, cuja intensidade é medida a 400 nm e é proporcional à concentração de heme na amostra.

As amostras de hemozoína utilizadas neste trabalho foram testadas para possíveis contaminações com ADN, proteínas e bactérias do género *Mycoplasma*. As metodologias detalhadas utilizadas na realização dos testes anteriormente referidos encontram-se no anexo iii.

A morfologia dos cristais de hemozoína foi analisada por microscopia electrónica de varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*). As imagens de microscopia electrónica de varrimento foram obtidas na Faculdade de Ciências da

Universidade de Lisboa pelo técnico Telmo Lopes. Dez microlitos de cada amostra de hemozoína foram colocadas sobre uma fita de carbono e deixou-se secar durante 24 horas. A metalização das amostras foi feita através da sobreposição de camadas finas de ouro, recorrendo ao equipamento JEOL JFC-1200. As imagens foram adquiridas com uma ampliação de 1500 X, 5000 X e 15000 X no equipamento JEOL JFC-5200 LV.

### **4.3 Equipamento utilizado**

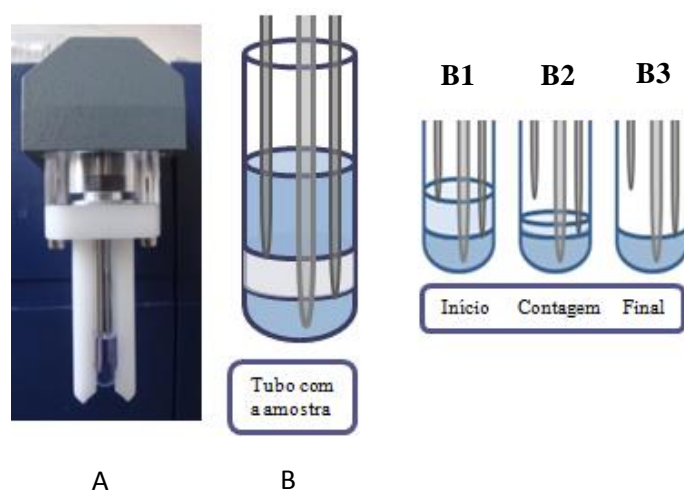
#### 4.3.1. Equipamento de uso corrente no laboratório

Na realização deste trabalho foi utilizado o seguinte equipamento de uso corrente: centrífugas (modelos 5415D e 5810R, Eppendorf, Madrid, Espanha), banho-maria (modelo DK-S12, Pioway, Nanjing, China), espectrofotómetro de bancada (WPA Biowave CO8000 Cell Density Meter, Biochrom Ltd, Cambridge, Reino Unido), estufa incubadora a 37°C com uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> (HERAcell 150, Heraeus Hanau, Alemanha) e câmara de fluxo laminar (Biosafety cabinet II-EN 2000, Faster, Cornaredo, Itália)

#### 4.3.2 Citómetro de fluxo

As análises citométricas foram realizadas no citómetro CyFlow® SL (Partec, Münster, Alemanha). O CyFlow® SL é um citómetro de bancada, de dimensões reduzidas, equipado com um laser sólido azul (488 nm) e detectores para cinco parâmetros: *Forward Scatter* (FSC), *Side Scatter* (SSC), fluorescência verde (FL1), fluorescência laranja (FL2) e fluorescência vermelha (FL3). O aparelho utilizado neste estudo foi modificado de forma a permitir a detecção de dois tipos de *Side Scatter*: o *Side Scatter* vertical e o *Side Scatter* horizontal ou depolarizado.

Este aparelho possibilita a obtenção de concentrações celulares através do método de Contagem Volumétrica Absoluta. O princípio deste método encontra-se esquematizado na Figura 4.



**Figura 4 Fotografia e Esquema representativos da contagem absoluta volumétrica.** A. Fotografia de um tubo com amostra no equipamento, onde é possível visualizar o mecanismo utilizado pelo equipamento para a contagem absoluta. B. Esquema de contagem absoluta de células. O equipamento aspira amostra até atingir o eléctrodo mais curto (B1). A contagem é iniciada e só termina quando o eléctrodo mais comprido deixa de detectar amostra (B3). O volume aspirado entre B1 e B3 é de 200  $\mu\text{L}$ .

#### 4.4 Obtenção e cultura das amostras celulares utilizadas

##### 4.4.1 Cultura de *Plasmodium falciparum*

Culturas in-vitro de eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* (estirpe 3D7), com um hematócrito de 10%, foram mantidas até atingirem uma parasitémia entre 2% e 4%.

As parasitémias foram monitorizadas através da observação microscópica de esfregaços corados com Giemsa. Para obter uma maior precisão, o cálculo foi efectuado a partir da observação de pelo menos 10 campos. As observações microscópicas foram realizadas por dois operadores de forma a validar as contagens.

Quando atingida a parasitémia desejada, as culturas foram centrifugadas a 1800 RPM de forma a se obter um *pellet* unicamente constituído por eritrócitos. Este *pellet* foi congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até ao momento da purificação da hemozoína nativa. A metodologia detalhada de purificação de hemozoína encontra-se descrita no anexo ii.

#### 4.4.2 Microrganismos utilizados

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a estirpe ATCC 12023 de *Salmonella entérica* serótipo Typhimurium, cedida pelo Doutor Jaime Mota (Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal). Esta estirpe expressa uma proteína fluorescente, GFP do inglês *Green Fluorescence Protein*. Esta propriedade permite a detecção de bactérias (ou de monócitos que fagocitaram bactérias) por citometria de fluxo.

As bactérias foram cultivadas em meio *Luria-Bertani* (LB) líquido com 100 µg/mL de ampicilina. A cultura foi realizada num agitador orbital, com uma agitação constante de 140 rpm, a 37° C, até ser atingida a fase exponencial tardia/ início da fase estacionária (17 horas). O crescimento da cultura bacteriana foi seguido através da medição da densidade óptica ao longo do tempo. As medições de absorvância foram realizadas num espectrofotómetro de bancada. A expressão de GFP foi igualmente monitorizada ao longo do tempo através de citometria de fluxo. Esta proteína é detectada pelo canal FL1 do Cyflow® (utilizando um filtro verde de 527/30 nm).

A cultura em meio sólido foi realizada através da inoculação de 100 µL de suspensão bacteriana em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina. Incubou-se durante a noite, possibilitando o crescimento de colónias individualizadas. Posteriormente quantificou-se as unidades formadoras de colónias (CFU, do inglês *colony forming units*).

#### 4.4.3 Células fagocitárias utilizadas e preparação

##### 4.4.3.1 Monócitos isolados a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*)

O isolamento de PBMCs foi efectuado a partir de *buffy-coats* cedidos pelo Instituto Português de Sangue (IPS). O isolamento de monócitos, a partir de *buffy-coats*, foi

realizado em duas etapas. Na primeira, recorreu-se a um gradiente de densidade com Lymphodex (Fresenius, Bad Homburg, Alemanha), de forma a isolar PBMCs. Na segunda, tomou-se partido das propriedades de aderência de monócitos. Todos os reagentes foram utilizados à temperatura ambiente de forma a não perturbar a estabilidade celular e a melhorar a qualidade da separação.

#### Isolamento de PBMCs por gradiente de densidade

O conteúdo do *buffy-coat* foi diluído em RPMI-1640 e foi depositado sobre o Lymphodex, numa proporção 1:1:1. Através de centrifugação a 1000 g, durante 20 minutos, à temperatura ambiente, obteve-se a separação em quatro camadas. A fracção contendo PBMCs (essencialmente constituída por monócitos e linfócitos) foi removida e lavada duas vezes com RPMI-1640, por centrifugação a 600 g, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Por fim o *pellet* foi ressuspensionado em RPMI-1640 e quantificado microscopicamente, por citometria de fluxo ou por ambos os métodos.

Para a quantificação por citometria, a suspensão de PBMCs foi diluída em PBS (1:10) e analisada. Através da análise do respectivo gráfico de *forward scatter* (FSC) vs. *Side Scatter* (SSC) foi possível determinar a quantidade percentual de monócitos na amostra e inferir a respectiva concentração. A suspensão de PBMCs foi diluída para uma concentração final de 500.000 monócitos/ mL de forma a obter confluência numa superfície de 1,86 cm<sup>2</sup> (poço de uma placa de 24 poços). A concentração de monócitos foi confirmada após a diluição, recorrendo à marcação com o anti-CD14-FITC.

#### Optimização do isolamento de monócitos a partir de PBMCs

A suspensão de PBMCs, com uma concentração previamente ajustada de 500.000 monócitos/ mL, foi distribuída por placas de 24 poços (1 mL/ poço). Esta concentração permite a obtenção de confluência, minimizando a perda celular aquando da purificação dos monócitos. Brevemente, para obter confluência são necessárias 250.000 células/

cm<sup>2</sup>. No caso das placas de 24 poços utilizadas, com 1,86 cm<sup>2</sup> de área, o número óptimo de monócitos a utilizar será 465.500/ poço (aproximadamente 500.000).

Incubaram-se as amostras numa estufa a 37°C, com uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, durante 30 minutos, duas, três e quatro horas. Após cada período de incubação os respectivos poços foram lavados três vezes com PBS 1x (à temperatura ambiente) de forma a retirar as células não aderentes. Após as lavagens, os monócitos foram ressuspensos, em PBS 1x e o conteúdo de cada poço foi transferido para tubos de citometria. A concentração de monócitos, no final da purificação, foi confirmada por citometria de fluxo. De forma a identificar os monócitos, estes foram marcados com anti-CD14-FITC.

Estabeleceu-se uma cinética de recuperação de monócitos calculando a taxa de recuperação ( $\eta$ ), relativamente ao inicial.

$$\eta = \frac{[\text{monócitos}]_{\text{final}}}{[\text{monócitos}]_{\text{início}}} \times 100$$

Como a concentração inicial foi ajustada a 500.000 monócitos/ mL então,

$$\eta = \frac{[\text{monócitos}]_{\text{final}}}{500.000} \times 100$$

Para os ensaios posteriores escolheu-se o tempo de incubação que melhor permitia satisfazer as condições de maior recuperação/ menor tempo de incubação.

#### 4.4.4 Sangue total

Todas as amostras sanguíneas utilizadas nos ensaios de sangue total provieram de dadores voluntários saudáveis, após o seu consentimento (Anexo iv).

As amostras sanguíneas foram colhidas em tubos contendo heparina sódica (B. Braun, Melsungen, Alemanha) excepto, quando expressamente explicitado.



#### **4.5 Optimização da opsonização de partículas**

Nos ensaios com monócitos isolados foi necessário estudar o efeito da opsonização na fagocitose de partículas (hemozoína, bio-partículas pHrodo<sup>TM</sup> ou *beads* de látex). Este efeito foi testado através da pré-incubação das partículas a opsonizar com soro, com plasma ou sem nada.

O soro autólogo do dador foi obtido através da colheita de sangue sem anti-coagulante. Após se ter deixado coagular o sangue durante uma hora, centrifugou-se a 3.000 g durante 10 minutos, de forma a obter separação. As partículas a opsonizar foram incubadas com soro (20 % v/v), durante 30 minutos num banho-maria a 37°C.

A obtenção de plasma é idêntica à obtenção de soro, diferindo apenas no facto do sangue ter sido colhido na presença de anti-coagulante (heparina sódica). A incubação ocorreu nas condições anteriormente referidas para a opsonização com soro.

#### **4.6 Ingestão de hemozoína: Optimização da concentração e tempo de incubação utilizados**

O sangue total, diluído (1:1) com RPMI-1640 ou os monócitos isolados por aderência, foram incubados com diferentes concentrações de hemozoína sintética (1 µM, 10 µM e 50 µM) ou *beads* de látex (0,1%). Incubaram-se durante duas, quatro e seis horas. Como controlo, reservaram-se os últimos poços de cada tempo de incubação, cujas suspensões celulares foram incubadas nas mesmas condições mas às quais nada foi adicionado.

No ensaio de sangue total, após cada tempo de incubação, o conteúdo dos poços foi homogeneizado e transferiu-se 200 µL de cada poço para tubos de citometria. Posteriormente, procedeu-se à lise dos eritrócitos.

No caso do ensaio com monócitos, após cada incubação, os poços foram lavados com PBS 1x (à temperatura ambiente), de forma a remover a hemozoína não ingerida. Os

monócitos foram ressuspensos em 1 mL PBS 1x. Após uma vigorosa homogeneização, transferiu-se o conteúdo de cada poço para tubos de citometria.

Todas as amostras foram marcadas com anti-CD14-FITC, a partir do qual foi possível fazer a identificação dos monócitos por citometria de fluxo, e no caso do ensaio com sangue total, distingui-los da população correspondente aos granulócitos. Verificou-se se a hemozoína teria influência sobre a viabilidade celular através da realização do teste de viabilidade com o corante PI.

Consoante a percentagem de depolarização de monócitos (que indica a percentagem de células que ingeriram hemozoína) escolheram-se os tempos de incubação e as concentrações de hemozoína que mais se adequavam aos ensaios que se pretendia realizar.

#### **4.7 Ensaio fagocítico**

A fagocitose de monócitos e de granulócitos foi quantificada utilizando o ensaio comercial pHrodo™ *E. coli* BioParticles®, seguindo as recomendações do fabricante, excepto quando explicitado.

O sangue total foi incubado durante quatro horas, numa incubadora com uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, ou procedeu-se directamente ao ensaio fagocítico. No caso dos ensaios com monócitos purificados as bio-partículas pHrodo™ foram opsonizadas com plasma autólogo antes da realização do ensaio fagocítico.

Vinte microlitros de bio-partículas pHrodo™ foram adicionados a 100 µL de sangue total ou a uma suspensão de monócitos purificados (500.000 monócitos num volume de 1 mL), numa razão de 20 partículas por fagócito e incubados a 37°C (em banho-maria ou numa estufa a 37°C, com uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>) ou a 4°C (no gelo) durante 15, 30, 90 e 180 minutos. Após cada tempo de incubação os tubos foram transferidos para o gelo de forma a parar a fagocitose.

Nos ensaios com sangue total a lise eritrocitária foi realizada utilizando os reagentes incluídos no pHrodo™ *E. coli* BioParticles® (cinco minutos de incubação com 100 µL de reagente A, seguidos de cinco minutos de incubação com 1 mL de reagente B, à temperatura ambiente) ou tampão de lise (2 mL de tampão de lise incubados durante 10 minutos à temperatura ambiente).

Posteriormente, marcou-se com anti-CD14 conjugado com FITC. No final da marcação procedeu-se a uma lavagem com PBS 1x sendo as células ressuspensas em PBS 1x até ao momento da análise.

A análise por citometria de fluxo foi realizada no prazo máximo de uma hora após a marcação das amostras.

#### 4.7.1 Ensaio de inibição da fagocitose

De forma a determinar se o sinal detectado em FL3 corresponde ao sinal proveniente do reagente pHrodo™ no interior das células fagocitárias, procedeu-se a um ensaio paralelo, onde o sangue foi colhido utilizando EDTA como anticoagulante. A utilização de EDTA, como anticoagulante, inibe a capacidade dos fagócitos de ingerir as bio-partículas pHrodo™. O tratamento da amostra foi feito como explicitado na secção anterior.

#### **4.8 Influência da ingestão de hemozina na capacidade fagocítica**

Monócitos, isolados como descrito na secção correspondente, foram pré-incubados com 10 µM e 50 µM de hemozina sintética ou com *beads* de látex, durante duas, seis e 24 horas. Como controlo, a cada tempo de incubação foram reservados poços aos quais nada foi adicionado. Após cada tempo de incubação, os poços foram lavados com PBS 1x de forma a remover a hemozina não ingerida. Os monócitos foram ressuspensos em meio de cultura (RPMI-1640) e transferidos para tubos de citometria. O ensaio fagocítico ocorreu incubando os monócitos com 20 µL de pHrodo™ durante 90 e 180

minutos. No final da incubação os tubos foram colocados no gelo de forma a parar a fagocitose. Todas as amostras foram marcadas com CD14-FITC.

#### 4.8.1 Influência do meio de cultura de incubação de monócitos com hemozoína

O meio de cultura de monócitos incubados com hemozoína 50  $\mu$ M durante seis (MHZ6) e 24 (MHZ24) horas foi recolhido e guardado a -80 °C até à realização do ensaio.

O ensaio consistiu na adição de MHZ a monócitos previamente isolados. MHZ6 foi centrifugado durante 10 minutos a 13.000 RPM. Adicionou-se à suspensão celular o sobrenadante ou o conteúdo total do meio. MHZ (24 horas), diluído 1:1, 1:4 ou não diluído, foi igualmente adicionado a monócitos. Como controlos, utilizaram-se monócitos aos quais foi adicionada hemozoína 50  $\mu$ M, ou nada.

Incubou-se durante quatro horas numa estufa a 37 °C, com uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. No final da incubação as amostras foram lavadas com PBS 1x e ressuspensas em RPMI-1640. De seguida, procedeu-se ao ensaio fagocítico (20  $\mu$ L de pHrodo™ durante 180 minutos). Após a incubação com as bio-partículas pHrodo™, os monócitos foram marcados com CD14-FITC e analisadas no prazo máximo de uma hora no CyFlow®.

A cada tempo de incubação foi, ainda destinado um poço por cada condição experimental para a realização do ensaio de viabilidade com PI e cálculo da taxa de recuperação ( $\eta$ ).

#### 4.8.2 Comparação dos ensaios fagocíticos utilizando as bio-partículas pHrodo™ e Phagotest™

O ensaio fagocítico utilizando as bio-partículas pHrodo™ baseia-se na acidificação do fagossoma, uma vez que as bio-partículas só emitem fluorescência detectável em pH ácido. Desta forma, comparou-se este ensaio com o Phagotest™, uma vez que este não depende da acidificação do fagossoma. Os monócitos purificados, como descrito na

secção correspondente, foram pré-incubados com 50  $\mu$ M de hemozoína sintética durante seis horas, ou procedeu-se directamente aos ensaios fagocíticos. Incubou-se a suspensão celular com 20  $\mu$ L pHrodo™ ou Phagotest™, durante 15, 90 e 180 minutos. Segundo as recomendações do fabricante, as bio-partículas phagotest™ não necessitam de opsonização previa, ao contrário das bio-partículas pHrodo™. Após cada tempo de incubação, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

#### **4.9 Ensaios com bactérias viáveis**

Utilizou-se esta estirpe de *Salmonella* para o desenvolvimento de ensaios ex-vivo de quantificação de fagocitose e capacidade bactericida. A capacidade fagocítica foi avaliada por citometria de fluxo num ensaio protegido com gentamicina.

##### 4.9.1 Optimização da incubação com gentamicina

As bactérias foram cultivadas como descrito anteriormente. A cultura bacteriana foi lavada três vezes com PBS 1x filtrado (filtro de 0,22  $\mu$ m). Ajustou-se a concentração bacteriana a  $5 \times 10^7$  unidades formadoras de colónias (CFU, do inglês *colony forming units*)/mL e incubou-se durante cinco, 10, 15, 20 e 30 minutos em RPMI contendo 100  $\mu$ g/mL de gentamicina. Após a incubação inoculou-se 100  $\mu$ L de suspensão bacteriana em meio LB sólido com ampicilina (100  $\mu$ g/mL). As placas foram incubadas durante a noite, de forma a permitir o crescimento de colónias isoladas. Posteriormente, foram quantificadas as CFU e inferiu-se uma taxa de sobrevivência bacteriana. Para a realização dos ensaios sob a protecção de gentamicina seleccionou-se o tempo de incubação que permitiu a obtenção de maior percentagem de morte bacteriana, mais rapidamente.

##### 4.9.2 Influência da opsonização prévia da suspensão bacteriana

O efeito da opsonização na fagocitose de bactérias foi testado através da sua pré-incubação com soro, plasma ou sem nada.

O soro autólogo do dador foi obtido através da colheita de sangue sem anti-coagulante. Após se ter deixado coagular o sangue durante uma hora, centrifugou-se a 3.000 g durante 10 minutos, de forma a obter separação. As partículas a opsonizar foram incubadas com soro (20 % v/v) durante 30 minutos num banho-maria a 37°C.

A obtenção de plasma é idêntica à obtenção de soro, diferindo apenas pelo facto de o sangue, ter sido colhido na presença de anti-coagulante (heparina sódica). A incubação ocorreu nas mesmas condições anteriormente referidas para a opsonização com soro.

#### 4.9.3 Influência da Ingestão de hemozoína na capacidade fagocítica

Monócitos isolados como descrito anteriormente, foram pré-incubados com 50 µM de hemozoína sintética ou com *beads* de látex, durante seis e 24 horas. Como controlo, a cada tempo de incubação foram reservados poços aos quais nada foi adicionado. Após cada tempo de incubação, os poços foram lavados com PBS 1x de forma a remover a hemozoína não ingerida. Os monócitos foram ressuspensos em meio de cultura (RPMI-1640).

Adicionou-se a cada poço, uma suspensão bacteriana de *Salmonella enterica* serótipo *Typhimurium* numa razão bactérias/ monócitos que permitisse a sua detecção por citometria de fluxo. A suspensão bacteriana foi cultivada nas condições anteriormente descritas e quantificada através da inoculação de diluições sucessiva em meio LB sólido (contendo 100 µg/mL de ampicilina).

Como controlo negativo para o ensaio fagocítico, seleccionaram-se poços aos quais imediatamente após a adição das bactérias, se fixou a suspensão celular com paraformaldeído 2%. Os monócitos foram incubados com as bactérias durante 15 e 60 minutos, numa incubadora a 37 °C.

Após cada tempo de incubação removeu-se o meio de cultura utilizado. Os poços foram então lavados, três vezes com RPMI-1640 contendo 100 µg/mL de gentamicina, de

forma a eliminar as bactérias não ingeridas. Incubou-se durante 15 minutos, à temperatura ambiente, com meio com gentamicina. Após esta incubação todos os poços foram lavados duas vezes com PBS 1x, de forma a remover a gentamicina.

Nesta fase adoptaram-se procedimentos distintos, consoante se estivesse a realizar o ensaio fagocítico ou bactericida.

#### 4.9.3.1 Ensaio fagocítico

Os monócitos foram ressuspensos em PBS 1x e transferidos para tubos de citometria devidamente colocados em gelo. Posteriormente, procedeu-se à marcação com CD14-PE. Após a marcação com CD14-PE, as amostras foram analisadas por citometria no intervalo máximo de uma hora.

#### 4.9.3.2 Ensaio bactericida

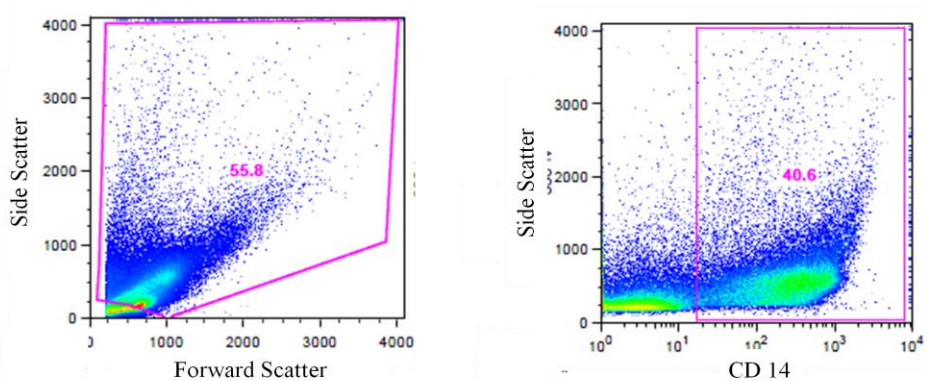
Para o ensaio bactericida, os monócitos foram ressuspensos e lavados três vezes com água bi-destilada. Deixou-se incubar durante 10 minutos de forma a garantir a lise dos monócitos e consequente libertação das bactérias fagocitadas. Inoculou-se 100 µL desta suspensão em meio LB sólido, contendo 100 µg/mL de ampicilina. Incubou-se durante a noite, possibilitando o crescimento de colónias individualizadas. Posteriormente, quantificaram-se as CFU obtidas para cada condição experimental e procurou-se estabelecer uma taxa de sobrevivência bacteriana relativamente ao inoculo inicial.

#### 4.10 Análise dos dados de citometria de fluxo

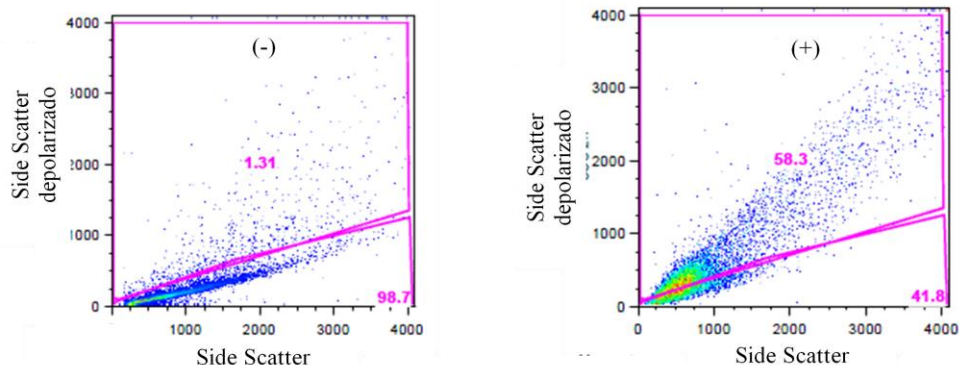
Os dados obtidos no CyFlow® foram analisados recorrendo ao *software FlowJo* versão 9.1 (TreeStar, Olten, Suíça).

Todas as amostras com marcação dupla foram compensadas com recurso a marcação simples para cada fluorocromo.

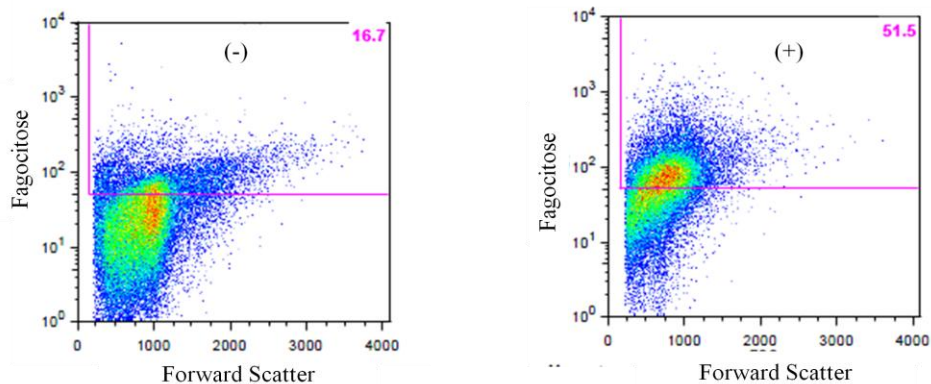
a) Estratégia de análise geral: delinearização de células



b) Depolarização de monócitos



c) Capacidade fagocítica de monócitos



**Figura 5 Estratégia de análise utilizada nos ensaios com monócitos purificados.** a) Estratégia geral de delinear a população de monócitos. No gráfico à esquerda é definida a população de células, a partir da qual se definiu a população de monócitos, pela sua positividade na fluorescência de anti-CD14-FITC (à direita). A população de monócitos sofreu dois tipos de análise, especificadas em b) e c). b) Análise da depolarização de monócitos, incubados na ausência (gráfico da esquerda) e na presença de hemozoína sintética produzida no Japão a uma concentração de 50 $\mu$ M (gráfico da direita). A incubação durou seis horas. c) Análise da capacidade fagocítica de monócitos, utilizando as bio-partículas pHrodo™. No gráfico da esquerda encontra-se representado um controlo negativo, no qual as bio-partículas foram incubadas com os monócitos a 4°C, não sendo assim ingeridas. É a partir do controlo a 4°C que é delineado o limite a partir do qual se admite que as bio-partículas foram fagocitadas. No gráfico da direita encontra-se representado um controlo positivo, no qual as bio-partículas foram incubadas com os monócitos a 37°C.



Nos ensaios com monócitos purificados, através do gráfico FSC e SSC foi definida uma região composta por eventos com tamanho e complexidade correspondente a células (monócitos e linfócitos). Os restantes eventos localizados fora da região R1 foram excluídos da análise, sendo esta região, essencialmente constituída por plaquetas e detritos celulares, de tamanho muito inferior ao de monócitos e linfócitos.

Tomou-se partido da marcação com o anti-CD14-FITC, detectado pelo canal FL1 do Cyflow®, de forma a identificar a população correspondente a monócitos no interior da região anteriormente referida. Após a identificação dos monócitos procedeu-se a dois tipos de análise (Figura 5).

Nos ensaios com sangue total utilizou-se a mesma estratégia de análise, com excepção de, na segunda etapa da análise, representada na Figura 5 como painel a) (gráfico da direita), se definiram duas populações, uma correspondente a monócitos (com um *Side Scatter* reduzido e positiva para a marcação com anti-CD14-FITC) e outra, correspondente a granulócitos (negativa para a marcação com anti-CD14-FITC e com maior *Side Scatter*). Após se definir quais as populações correspondentes a monócitos e granulócitos, cada uma delas sofreu os dois tipos de análise evidenciados nos painéis b) e c) da Figura 5. A delineação do limite a partir do qual se considerou que os granulócitos estivessem a fagocitar as bio-partículas encontra-se representada na figura 14 da secção dos resultados.

A análise do ensaio fagocítico utilizando bactérias viáveis seguiu o mesmo esquema explicado na Figura 5, com a excepção de que a população correspondente a monócitos foi identificada através do gráfico de SSC e FL3 (painel a) gráfico da direita), pois os monócitos foram marcados com anti-CD1-PE e a fagocitose quantificada a partir do gráfico FSC e FL1, uma vez que as bactérias viáveis utilizadas para a quantificação expressam GFP (detectável em FL1) (painel c)).

## 5. Resultados

### 5.1 Hemozoína: análise quantitativa e qualitativa

Através do ensaio comercial Quantichrom® foi possível quantificar as amostras de hemozoína utilizadas neste trabalho.

**Tabela 1: Tipo e concentração das diferentes hemozoínas usadas**

| <b>Tipo de Hemozoína</b>  | <b>Concentração (mM)</b> |
|---|--------------------------|
| <b>Hemozoína sintética (produzida no Instituto de Medicina Molecular)</b> | 3,03                     |
| <b>Hemozoína sintética (produzida no Japão)</b>                           | 7,8                      |
| <b>Hemozoína nativa</b>   | 1,36                     |

As concentrações de hemozoína utilizadas nos diversos ensaios, foram ajustadas por diluição das soluções *stock*, quantificadas por esta metodologia. No anexo vi encontram-se as densidades ópticas e os cálculos necessários para a obtenção das concentrações de hemozoína referidas no Tabela 1.

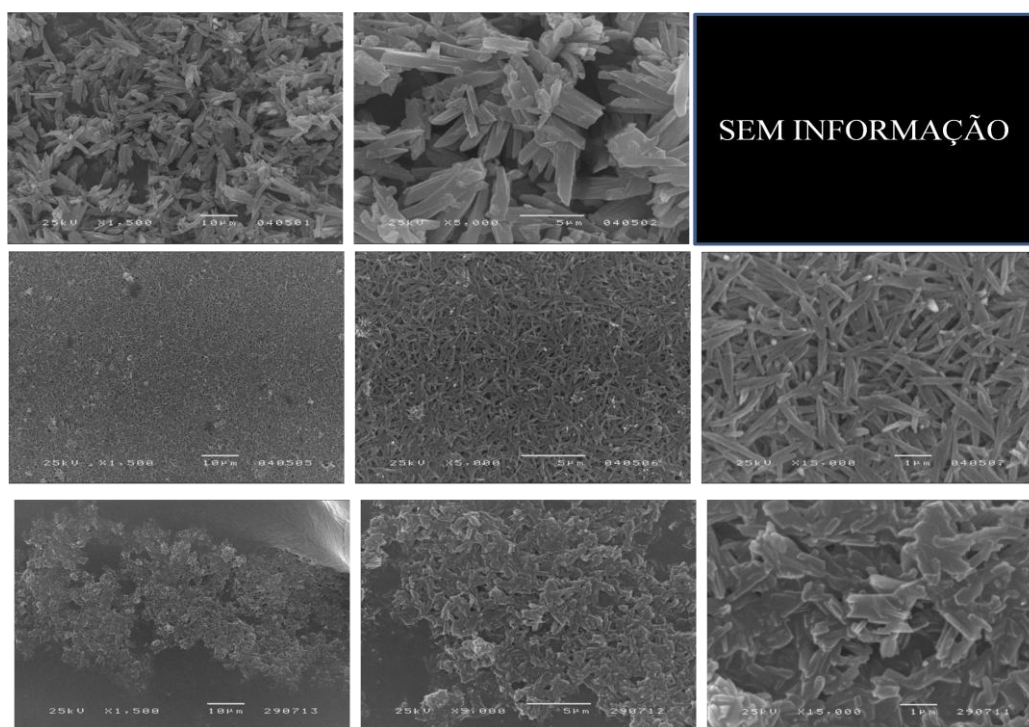
Todas as amostras de hemozoína utilizadas neste trabalho apresentaram um conteúdo hémico inferior a 1%, significando que não se encontravam contaminadas com a unidade monomérica dos cristais de hemozoína – heme. As imagens dos respectivos cromatogramas, obtidos para cada amostra de hemozoína testada, encontram-se no anexo vi.

Nenhuma das amostras de hemozoína sintética e nativa se encontravam contaminadas com bactérias do género *Mycoplasma* nem com ADN. As imagens dos respectivos géis de agarose, utilizados para verificar as possíveis contaminações, anteriormente referidas, encontram-se no anexo vi.

A hemozoína sintética não apresenta contaminação com proteínas. Este facto era expectável, uma vez que este cristal é produzido quimicamente, a partir da  $\beta$ -hematina. Contrariamente, na hemozoína nativa, obtida por purificação de culturas de *Plasmodium falciparum*, verificou-se a presença de contaminantes proteicos. No anexo vi encontra-se a imagem do gel de poliacrilamida utilizado para verificar possíveis contaminações com proteínas.

Através da análise das imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento (Figura 6) foi possível concluir que os cristais de hemozoína utilizados nos ensaios, apresentavam uma aparência morfológica e estrutural similar ao descrito.

No que respeita ao tamanho, os cristais de hemozoína sintética produzidos no Instituto de Medicina Moleculas (IMM), apresentavam as dimensões esperadas de acordo com a



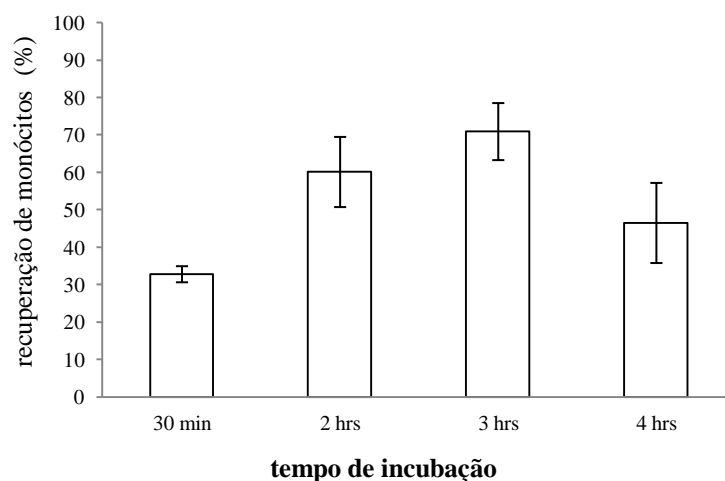
**Figura 6: Imagens de microscopia electrónica obtidas para os diferentes tipos de hemozoína.** A primeira linha representa a hemozoína produzida Japão, a segunda linha representa a hemozoína sintética produzida no IMM e a terceira linha a hemozoína nativa. As colunas representam as diferentes ampliações a que as imagens foram adquiridas. Colunas da esquerda para a direita: ampliações de 1500 X, 5000 X e 15.000 X. Hemozoina produzida no Japão sem imagem de 15.000 X.

metodologia de cristalização rápida utilizada para a sua produção, isto é, cerca de 1  $\mu\text{m}$  por cristal (cristais com tamanhos compreendidos entre 1,4 e 1,9  $\mu\text{m}$ ). Os cristais de hemozoína nativa apresentavam um tamanho médio de 1,3  $\mu\text{m}$ . A hemozoína produzida pelos nossos colaboradores no Japão, apresenta dimensões superiores aos cristais de heemozoína nativa e sintética produzida no IMM. Estes cristais são morfológicamente idênticos, no entanto, apresentam um tamanho de cerca de 5  $\mu\text{m}$  por cristal.

## 5.2 Optimização do isolamento de monócitos a partir de PBMCs

A purificação de monócitos, a partir de PBMCs, foi conseguida tomando partido da capacidade de aderência deste tipo de células.

Anteriormente ao processo de purificação por aderência, a suspensão celular foi quantificada através de citometria de fluxo. Incubaram-se as amostras de forma a se estabelecer uma cinética da taxa de recuperação celular ( $\eta$ ).



**Figura 7: Taxa de recuperação de monócitos após a purificação por aderência.** Incubação durante 30 minutos, duas, três e quatro horas.

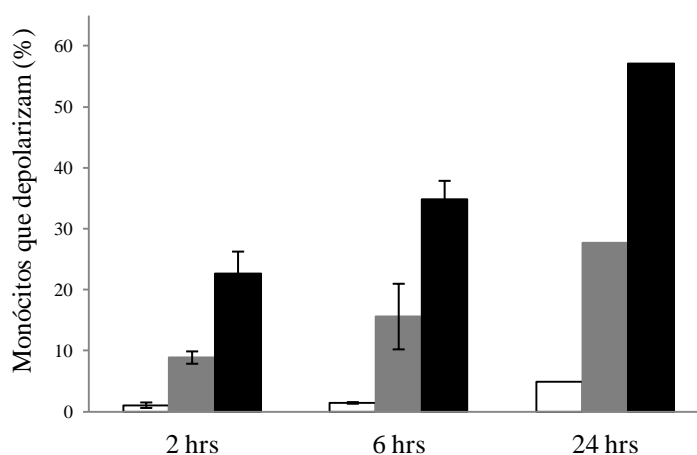
Após duas e três horas de incubação obtêm-se os valores de recuperação celular mais elevados, 60,0 % e 70,8 % respectivamente, como se pode verificar pela observação da Figura 7. Nos ensaios subseqüentes utilizou-se uma incubação de purificação com uma

duração de duas horas pois possibilita a recuperação de um número de células suficiente para a realização de análises citométricas conclusivas, com um menor gasto de tempo.

### 5.3 Ingestão de hemozoína: otimização da concentração e tempo de incubação utilizados

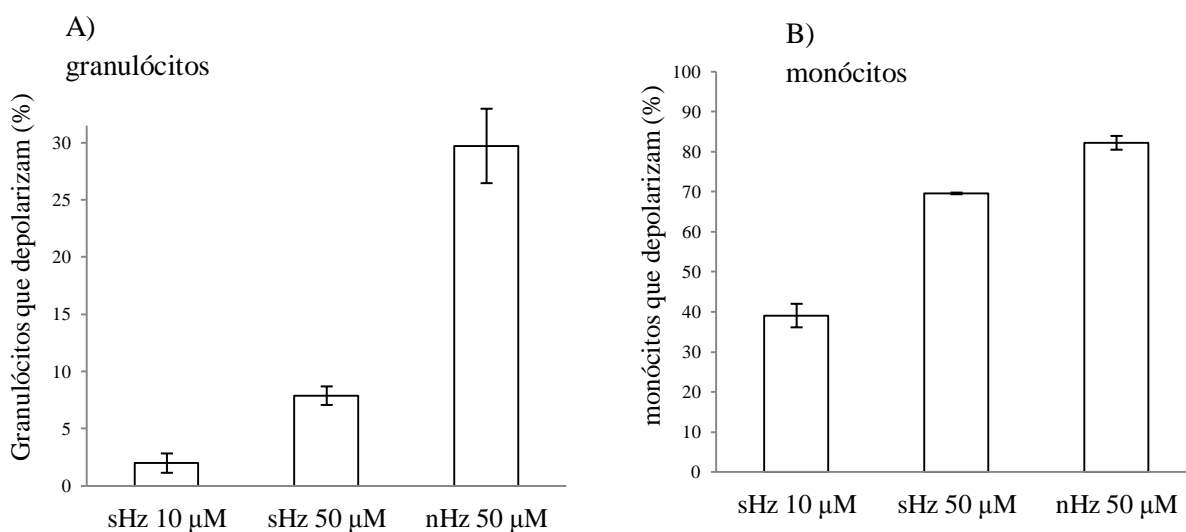
Sangue total ou monócitos isolados e purificados segundo a metodologia, anteriormente especificada (500.000 monócitos/ mL com uma taxa de recuperação de 50%, após a purificação), foram incubados com diferentes concentrações de hemozoína sintética produzida no Japão (sHz) e hemozoína nativa (nHz).

Através da análise por citometria de fluxo, foi possível determinar a taxa de ingestão de hemozoína (Figura 8 e Figura 9).



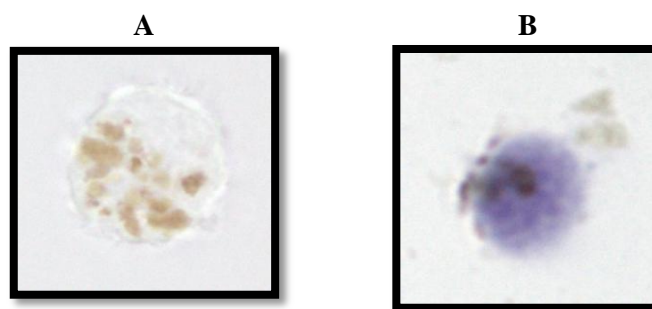
**Figura 8: Ingestão de diferentes concentrações de hemozoína por monócitos purificados.** Taxa de ingestão após a incubação de monócitos purificados com 1, 10 e 50  $\mu$ M (barras brancas, negras e cinzentas respectivamente) de hemozoína sintética (produzida no Japão) durante duas, seis (amostras em triplicado) e 24 horas (uma amostra para cada concentração de hemozoína).

Pela análise da Figura 8 e da Figura 9 verifica-se que a hemozoína é, predominantemente, ingerida por monócitos. Observam-se taxas de ingestão da hemozoína nativa superiores às observadas para a mesma concentração de hemozoína sintética. A ingestão de hemozoína pelas células fagocitárias é proporcional à quantidade de hemozoína adicionada.



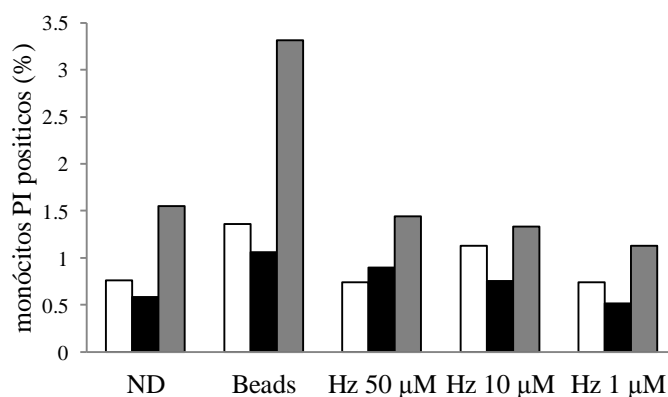
**Figura 9: Ingestão de diferentes concentrações de hemozoína por monócitos e granulócitos (sangue total).** Taxa de ingestão após a incubação de sangue total com 10 e 50  $\mu$ M de hemozoína durante quatro horas. O painel A representa a taxa de ingestão de hemozoína por granulócitos e o painel B por monócitos. sHz- hemozoína sintética produzida no Japão; nHz – hemozoína nativa.

A presença de hemozoína no interior dos monócitos foi confirmada por microscopia óptica. Nos painéis A e B da Figura 10 é possível observar hemozoína no interior de monócitos.



**Figura 10: Imagens representativas de microscopia óptica de monócitos que ingeriram ou não hemozoína.** O painel A corresponde a imagem adquirida a partir de preparações a fresco, e o painel B a uma preparação previamente fixada e corada com corante de *Giemsa*. Nos painéis A e B é possível observar hemozoína no interior dos monócitos. Imagens adquiridas com o microscópio Leica DM2500, com uma ampliação de 1000x.

De forma a determinar se a ingestão de hemozoína estaria a comprometer a viabilidade celular, marcaram-se amostras, incubadas nas mesmas condições anteriormente referidas, com iodeto de propídeo (PI). O PI é uma molécula fluorescente que se intercala com o ADN, caso a membrana citoplasmática se encontre danificada. Assim, quanto menor for o sinal de fluorescência emitido por esta molécula, maior será a viabilidade celular da amostra. Pela análise da Figura 11, na qual se encontra graficamente representado o sinal de PI das amostras incubadas durante duas, seis e 24 horas, com e sem hemozoína, verifica-se que a presença da hemozoína, no interior dos monócitos, causa apenas uma pequena redução na viabilidade.



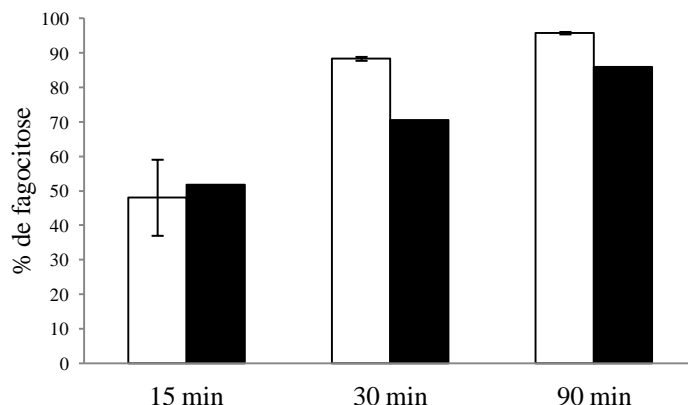
**Figura 11: Percentagens de monócitos corados com iodeto de propídio (PI).** Viabilidade celular de monócitos purificados após a incubação durante duas, seis e 24 horas (barras brancas, negras e cinzentas, respectivamente) sem nada (ND) com *beads* de látex (Beads) ou com diferentes concentrações (1, 10 e 50 µM) de hemozoína sintética produzida no Japão (sHz). Amostras não realizadas em triplicado.

## 5.4 Ensaio fagocítico

### 5.4.1 Optimização do ensaio fagocítico

De forma a determinar qual o tempo de incubação com as bio-partículas pHrodo™ que proporcionava a obtenção de resultados experimentais mais próximos do esperado (mais do que 65 % dos monócitos e de 90 % dos granulócitos capazes de fagocitar), realizou-se um ensaio onde se incubou sangue total, com as bio-partículas durante 15, 30 e 90 minutos. Uma vez que nos ensaios de estudo da influência da hemozoína seria

necessário pré-incubar o sangue com o hemozoína, procedeu-se à comparação da capacidade fagocítica de amostras processadas imediatamente a seguir à colheita do sangue (T0) e após uma incubação durante quatro horas (T4).



**Figura 12: Capacidade fagocítica de granulócitos.** Barras a branco representam a capacidade fagocitária de granulócitos sem incubação – T0. As barras a negro representam a capacidade fagocitária de granulócitos incubados durante quatro horas – T4. O ensaio fagocítico decorreu durante 15, 30 e 90 minutos.

Comparando a capacidade fagocítica das amostras sem incubação (T0), com as previamente incubadas (T4), verifica-se uma tendência semelhante ao longo dos diferentes tempos de duração do ensaio fagocítico. Pode-se, assim concluir que, uma pré-incubação de quatro horas, não afecta a funcionalidade celular, de forma a poder interferir com os resultados obtidos.

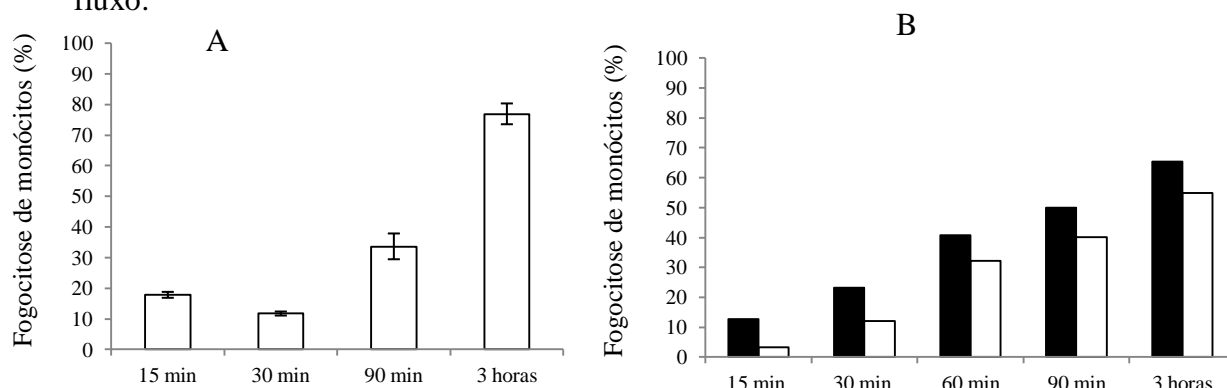
Pela observação da Figura 12 é possível verificar que, após uma incubação de 90 minutos com as bio-partículas de quantificação da fagocitose, se obtém uma taxa de ingestão superior a 80%.

Nos ensaios com monócitos purificados, que envolvem diversas incubações com as células aderentes em placa, foi pertinente quantificar a capacidade fagocitária das células aderentes e compará-las com a de células em suspensão no meio de cultura.

Em ambas as metodologias é necessário remover os monócitos aderentes através de raspagem, o que pode perturbar a estabilidade celular. No entanto, na metodologia na qual as bio-partículas são incubadas com os monócitos aderentes, este procedimento será realizado no final do ensaio fagocítico, imediatamente antes da marcação com anti-



CD14-FITC e da análise por citometria de fluxo. No caso do ensaio, no qual as células se encontram em suspensão, a raspagem dos monócitos é feita antes da incubação com as bio-partículas, permitindo aos monócitos recuperar alguma estabilidade durante a incubação e antes da marcação com anti-CD14-FITC e da análise por citometria de fluxo.



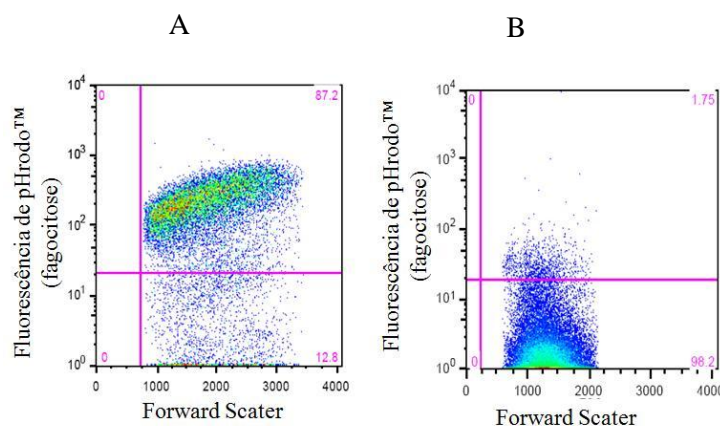
**Figura 13: Quantificação da capacidade fagocítica de monócitos aderentes ou em suspensão.** Painel A - monócitos aderentes incubados com as bio-partículas pHrodo™ durante 15, 30, 90 minutos e três horas. Painel B – monócitos em suspensão incubados com as bio-partículas durante 15, 30, 60, 90 minutos e três horas. Comparação entre a incubação com as bio-partículas pHrodo™ em banho-maria (barras a negro) e na estufa a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub> (barras a branco). Amostras não realizadas em triplicado.

No ensaio fagocítico, usando as células em suspensão, foi feita a comparação entre a incubação com as bio-partículas em banho-maria ou numa estufa a 37°C, com uma atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub> – Figura 13, painel B. Pela observação da Figura 13 pode-se concluir que, em ambos os suportes, a quantificação da fagocitose segue uma tendência semelhante, ao longo do tempo.

A magnitude da fagocitose após a incubação das bio-partículas com monócitos aderentes (Figura 13, painel A) ou com monócitos em suspensão (Figura 13, painel B) é similar. Nos ensaios subsequentes, optou-se pela metodologia de quantificação da fagocitose com monócitos em suspensão (incubação da suspensão celular em banho-maria).

### 5.2.2 Ensaio de inibição da fagocitose

De forma a determinar se o sinal detectado em FL3 correspondia de facto à fluorescência de pHrodo™ no interior das células fagocíticas, procedeu-se a um ensaio no qual as amostras sanguíneas foram colhidas para um tubo com EDTA como anti-coagulante.



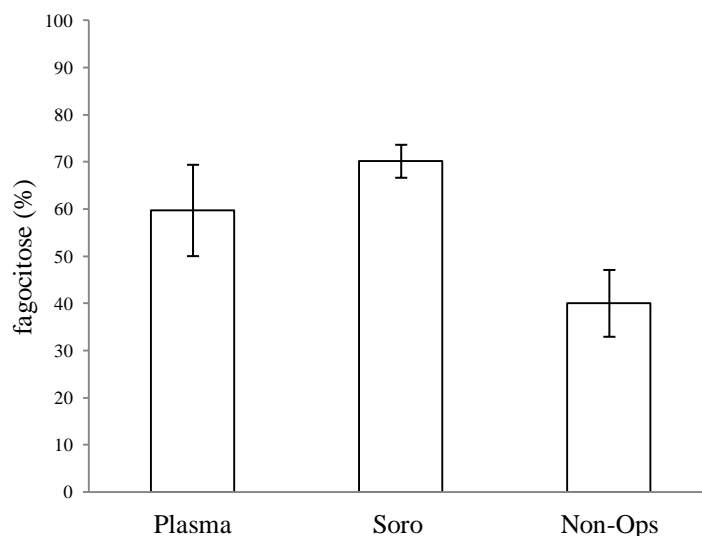
**Figura 14: Análise da capacidade fagocítica de granulócitos processados na presença e na ausência de EDTA.** O painel A representa as amostras processadas na ausência de EDTA (87,2% fagocitaram) e o painel B representa as amostras processadas na presença de EDTA (1,7% fagocitaram).

Pela análise da Figura 14 verifica-se que as amostras onde o ensaio foi realizado a partir de sangue colhido em EDTA apresentam uma fluorescência em FL3 inferior e apenas 1,7% das células fagocitaram. Nas amostras controlo (colhidas em heparina) verifica-se uma capacidade fagocítica de 87,2%.

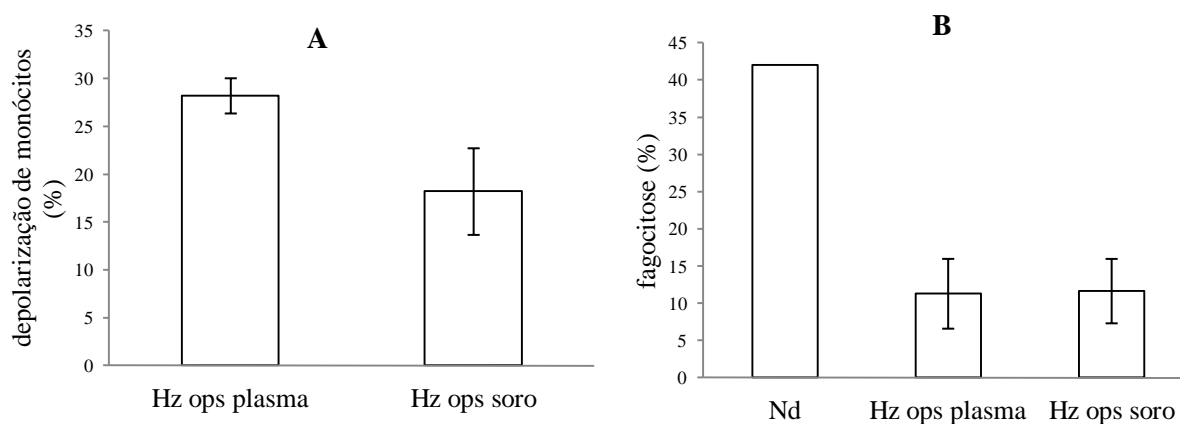
### 5.5 Optimização das condições de opsonização

De forma a maximizar a capacidade dos monócitos de fagocitarem hemozoína e posteriormente as bio-partículas pHrodo™ foi pertinente investigar qual a influência da opsonização. A opsonização das partículas promove a fagocitose, como se pode observar pelos resultados obtidos (Figura 15). As amostras não opsonizadas apresentam uma taxa de fagocitose inferior, em comparação com as amostras opsonizadas. Comparando a opsonização com plasma ou com soro, a taxa de ingestão de partículas

opsonizadas com soro é superior à observada para partículas opsonizadas com plasma (Figura 15).



**Figura 15: Influência da opsonização das bio-partículas pHrodo™ na fagocitose.** Taxa de fagocitose de bio-partículas pHrodo™ opsonizadas com soro, plasma ou não opsonizadas.



**Figura 16: Influência da opsonização na ingestão de hemozoína.** Painel A – Taxa de ingestão de hemozoína opsonizada com soro ou com plasma. Painel B – Quantificação da capacidade fagocítica de monócitos previamente incubados com hemozoína opsonizada com soro (Hz ops soro) ou plasma (Hz ops plasma) ou sem hemozoína (Nd) (amostra não realizada em triplicado).

No caso da hemozoína, a opsonização não parece interferir com o efeito causado na posterior fagocitose das bio-partículas pHrodo™ (Figura 16, painel B). Desta forma escolheu-se utilizar plasma em todas as opsonizações.

## **5.6 Influência da ingestão de hemozoína na capacidade fagocítica**

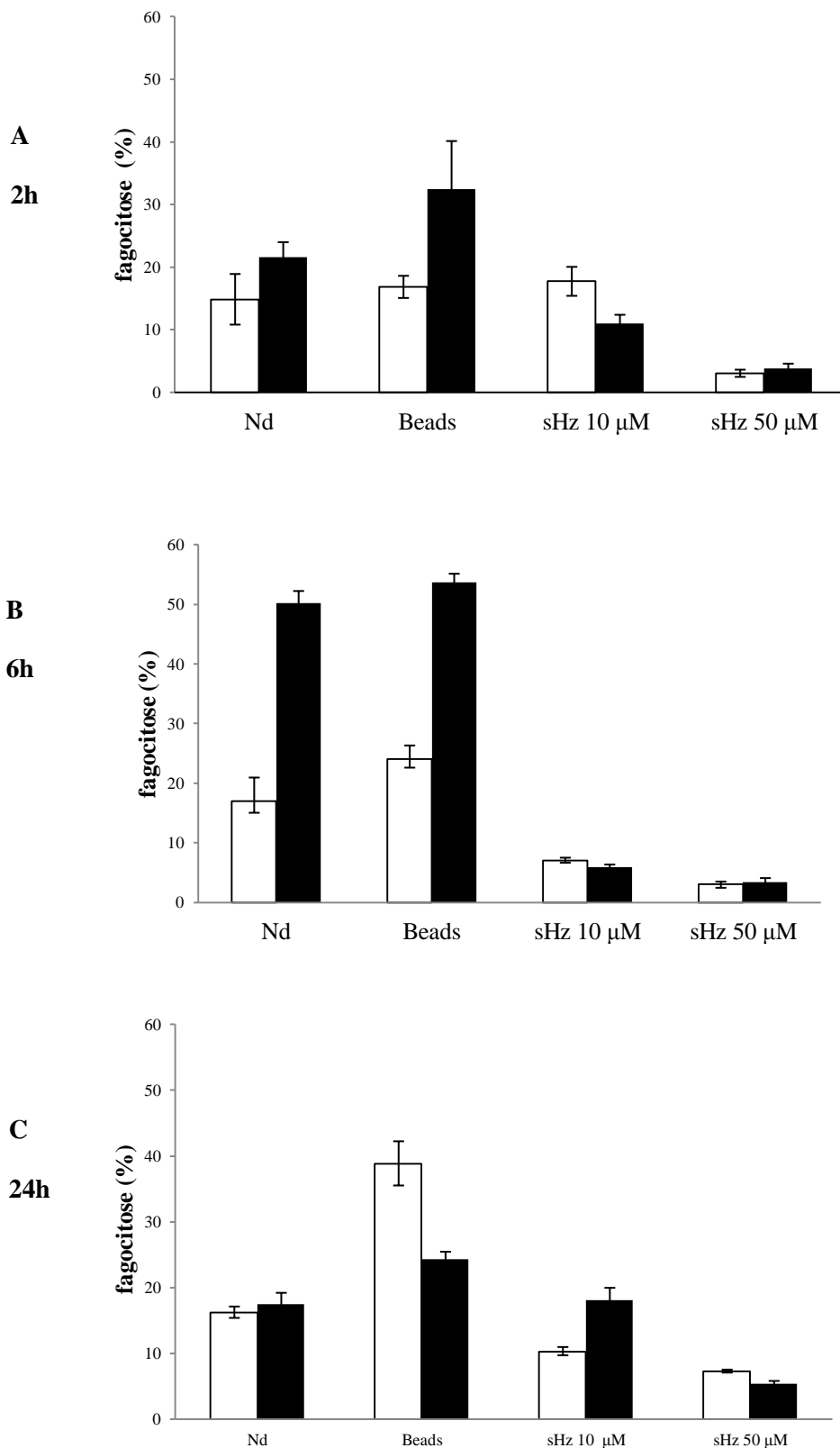
Estudou-se a influência da ingestão prévia de hemozoína na capacidade fagocítica de monócitos e granulócitos. Para este fim, incubou-se sangue total e monócitos com hemozoína sintética (sHz) e nativa (nHz). O sangue total foi incubado com hemozoína, durante quatro horas, enquanto os monócitos foram incubados durante duas, seis e 24 horas. Posteriormente, quantificou-se a capacidade fagocítica recorrendo-se às metodologias explicadas na secção apropriada.

A presença de hemozoína sintética (sHz) influencia a capacidade fagocitária de monócitos (Figura 17). Este efeito é evidente após, apenas duas horas de incubação com 50  $\mu\text{M}$  de sHz (Figura 17, painel A). No entanto, nas amostras pré-incubadas com a concentração mais baixa de sHz (10  $\mu\text{M}$ ) este efeito não é tão demarcado.

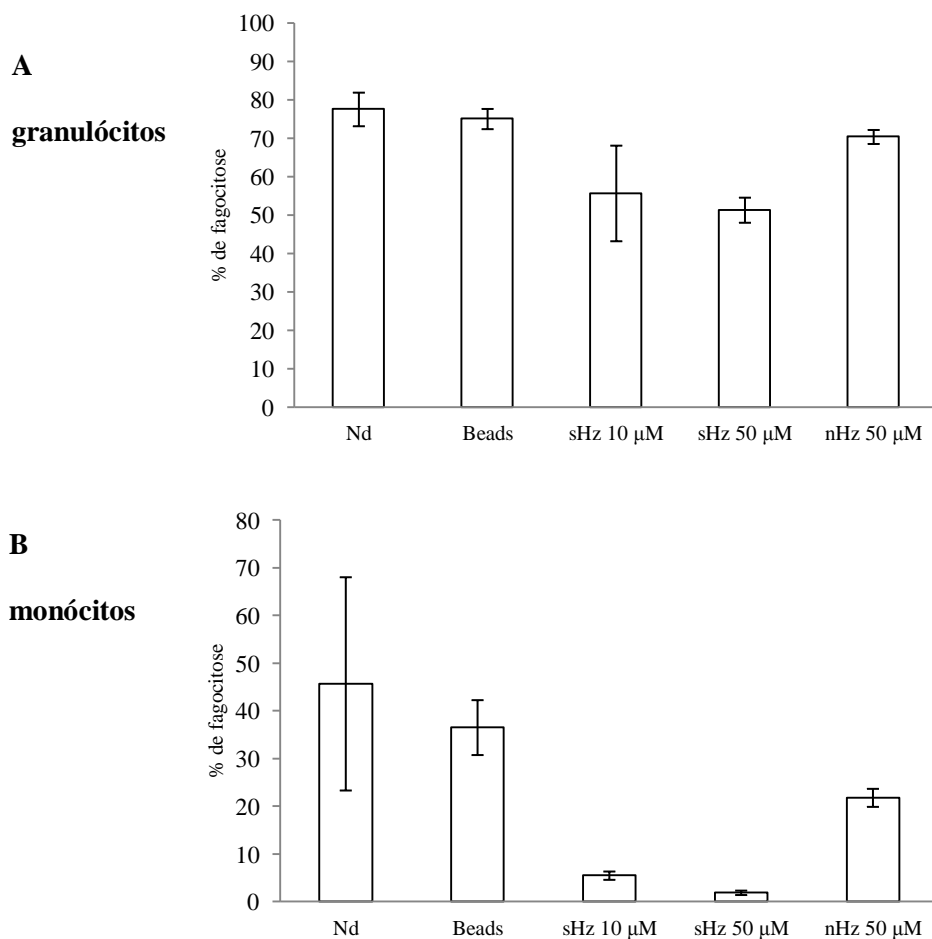
O efeito inibitório da hemozoína é mais pronunciado às seis horas de incubação (painel B). Ambas as concentrações de hemozoína afectam, de forma significativa, a capacidade fagocitária de monócitos.

No entanto, após 24 horas de incubação, seria de esperar uma diferença ainda mais demarcada, relativamente aos controlos, uma vez que os monócitos ingeriram grandes quantidades de hemozoína. No entanto, tal facto não se verifica.

Nos ensaios de sangue total verifica-se uma tendência similiar comparado com os ensaios com monócitos purificados. Na Figura 18 encontra-se representada graficamente a capacidade fagocítica de monócitos e granulócitos previamente incubados, durante quatro horas, na presença e na ausência de hemozoína.



**Figura 17: Capacidade fagocítica de monócitos pré-incubados com e sem hemozoína sintética.** Os monócitos foram pré-incubados com 10  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de hemozoína sintética (sHz) produzida no Japão ou sem hemozoína (com *beads* de látex – Beads ou sem nada – Nd). Os monócitos foram pré-incubados com ou sem sHz durante duas (painel A), seis (painel B) e 24 horas (painel C). As barras a branco correspondem a um ensaio fagocítico de curta duração, no qual as bio-partículas pHrodo™ foram incubadas durante 90 minutos com os monócitos. As barras a negro representam um ensaio fagocítico de três horas.

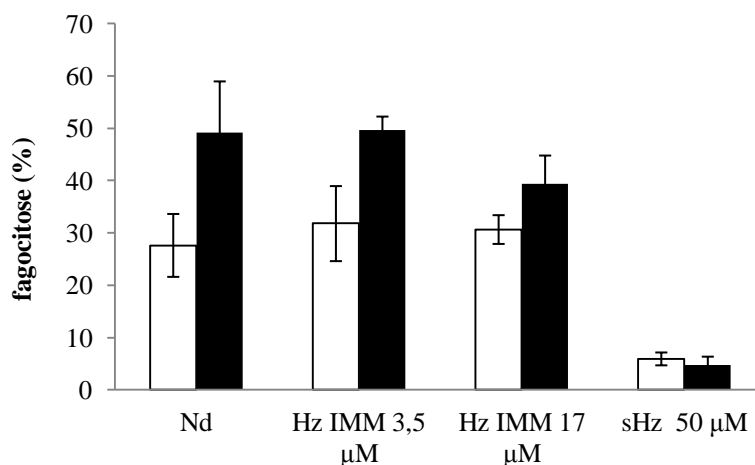


**Figura 18: Capacidade fagocítica de monócitos e granulócitos (sangue total) pré-incubados com hemozoína.** Capacidade fagocítica de granulócitos (A) e monócitos (B) incubados durante quatro horas, sem nada (Nd), com *beads* de látex (Beads) ou com diferentes concentrações (10 e 50 µM) de hemozoína sintética (sHz) e nativa (nHz)

Verifica-se que a capacidade fagocitária de monócitos e granulócitos encontra-se diminuída nas amostras previamente incubadas com hemozoína (Figura 18). As populações correspondentes a monócitos e granulócitos apresentam uma capacidade fagocitária diminuída de 90% e 30% respectivamente, em relação ao controlo.

Contrariamente ao que seria de esperar, uma vez que a hemozoína nativa se acumula no interior dos fagócitos a uma taxa muito mais elevada do que hemozoína sintética (Figura 9), a fagocitose de células pré-incubadas com este tipo de hemozoína não

apresenta uma inibição tão demarcada (diminuição de 52 % em monócitos de 9 % em granulócitos).



**Figura 19: Capacidade fagocítica de monócitos pré-incubados com e sem hemozoína sintética.** Capacidade fagocítica de monócitos incubados durante seis horas sem nada (Nd) com *beads* ou com diferentes concentrações de hemozoína sintética produzida no Japão (sHz) ou no IMM (Hz IMM). As barras a branco correspondem a um ensaio fagocítico de curta duração, no qual as bio-partículas pHrodo™ foram incubadas durante 90 minutos com os monócitos. As barras a negro representam um ensaio fagocítico de três horas.

Os monócitos pré-incubados com hemozoína sintética produzida no IMM não apresentaram uma diminuição da capacidade fagocítica tão demarcada, como se verifica no caso dos monócitos pré-incubados com hemozoína sintética produzida no Japão (Figura 19).

De forma a determinar se o efeito inibitório da hemozoína se cingia aos monócitos que a tinham ingerido ou se este efeito abrangia todas as células sujeitas ao mesmo ambiente, analisou-se a capacidade fagocitária de monócitos contendo hemozoína (que depolarizavam) e de monócitos não contendo hemozoína (não depolarizavam).

Nos diferentes ensaios independentes com monócitos purificados não foi possível estabelecer uma diferença conclusiva, entre a capacidade fagocítica de monócitos que ingeriram hemozoína e que não ingeriram hemozoína. No caso dos dados 1, 2 e 4 (ver Tabela 2) verifica-se que ambas as populações de monócitos apresentam uma capacidade fagocítica semelhante e, as diferenças observadas, não são significativas. No

caso do dador 3, os monócitos que ingeriram hemozoína aparentam apresentar uma capacidade fagocítica superior relativamente aos monócitos que não ingeriram hemozoína.

**Tabela 2: Diferenças entre a capacidade fagocítica de monócitos que ingeriram, ou não, hemozoína, em comparação com o controlo (não incubado com hemozoína).**

|                | Capacidade fagocítica de monócitos não incubados com hemozoína (%) | Capacidade fagocítica de monócitos incubados com hemozoína |                                       |
|----------------|--|--|---------------------------------------|
|                |  | Monócitos que não ingeriram hemozoína (%)                  | Monócitos que ingeriram hemozoína (%) |
| <b>Dador 1</b> | 2,84   | 0,08   | 0,07                                  |
| <b>Dador 2</b> | 50,2   | 2,27   | 3,89                                  |
| <b>Dador 3</b> | 49,3   | 3,82   | 14,43                                 |
| <b>Dador 4</b> | 18,3   | 1,23   | 3,63                                  |

Monócitos purificados incubados durante seis horas com hemozoína sintética produzida no Japão (50 µM). Ensaio fagocítico durante 180 minutos.

**Tabela 3: Diferenças entre a capacidade fagocítica de monócitos/granulócitos que ingeriram, ou não, hemozoína, em comparação com o controlo (não incubado com hemozoína).**

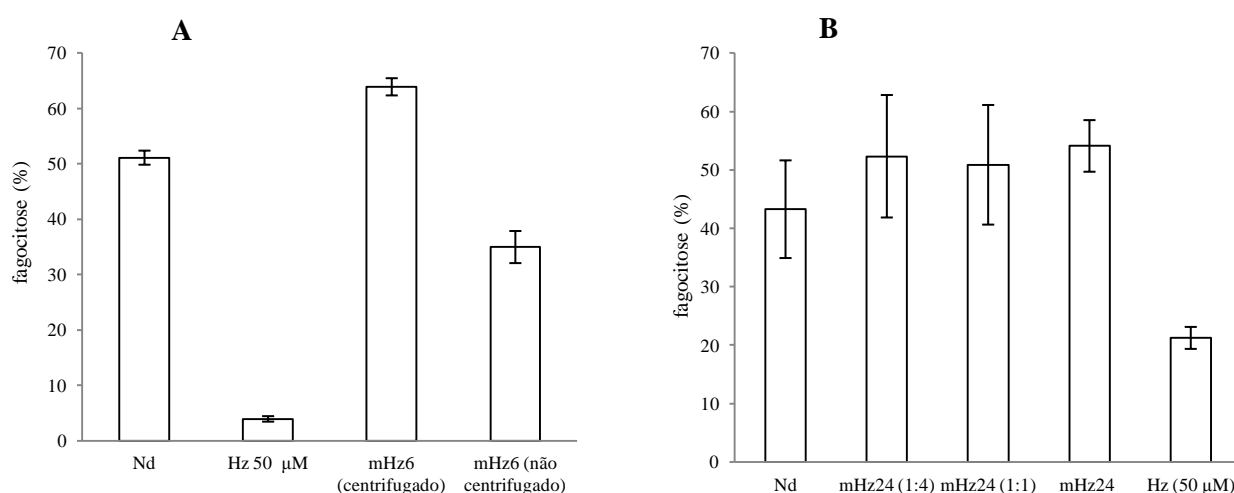
|                | Monócitos  |  |                                       | Granulócitos  |   |  |
|----------------|--|--|---------------------------------------|---|---|--|
|                | Capacidade fagocítica de monócitos não incubados com Hemozoína (%) | Capacidade fagocítica de monócitos incubados com hemozoína |                                       | Capacidade fagocítica de granulócitos não incubados com Hemozoína (%) | Capacidade fagocítica de granulócitos incubados com hemozoína |  |
|                |  | Monócitos não que Ingeriram hemozoína (%)                  | Monócitos que Ingeriram hemozoína (%) |   | Granulócitos que não Ingeriram hemozoína (%)                  | Granulócitos que Ingeriram hemozoína (%) |
| <b>Dador 1</b> | 40,1   | 6,3  | 1,2                                   | 67,6  | 42,7  | 7,6                                      |
| <b>Dador 2</b> | 45,7   | 5,9  | 0,4                                   | 77,5  | 54,9  | 18,3                                     |
| <b>Dador 3</b> | 55,1   | 23,2   | 3,9                                   | 72,0  | 41,5  | 20,9                                     |

Sangue total incubado durante quatro horas com hemozoína sintética produzida no Japão (50 µM). Ensaio fagocítico durante 180 minutos.



Nos diferentes ensaios independentes com sangue total (Tabela 3) verifica-se que os monócitos e granulócitos que ingeriram hemozoína apresentam uma capacidade fagocítica reduzida, relativamente aos monócitos que não ingeriram hemozoína.

Associado ao facto de nos ensaios com monócitos purificados (Tabela 2) as diferenças entre a capacidade fagocítica de monócitos que ingeriram hemozoína e que não ingeriram hemozoína ser reduzida, formulou-se a hipótese de que as células que ingerem a hemozoína estariam eventualmente a libertar moléculas/ substâncias que sinalizassem uma inibição da actividade dos fagócitos, que se encontrassem na proximidade, e que este “efeito” poderia estar no meio da cultura.



**Figura 20 Influência do meio de cultura na capacidade fagocítica de monócitos.** Capacidade fagocítica de monócitos incubados com e sem hemozoína sintética (Japão) e com meio proveniente da incubação de monócitos com hemozoína durante seis (mHz6 – painel A) e 24 horas (nHz24 – painel B). Incubações duraram quatro horas. O ensaio fagocítico com a duração de três horas.

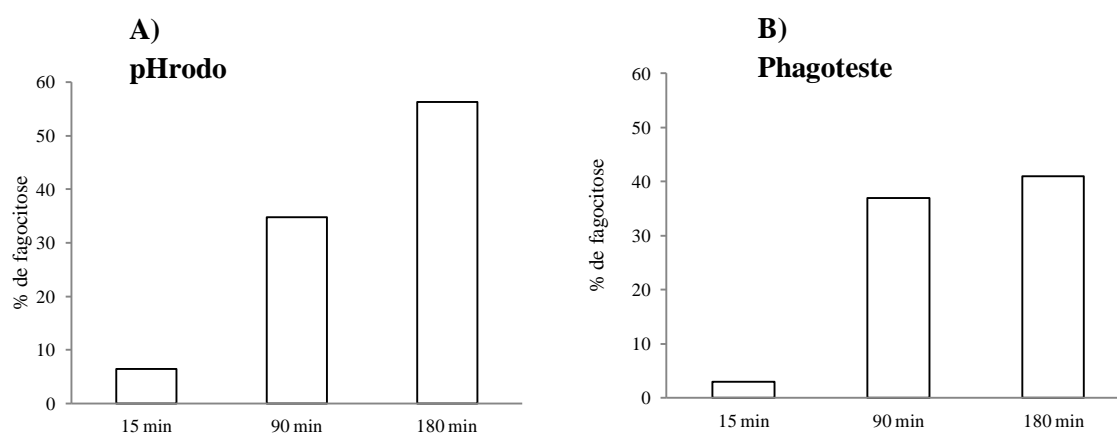
Após uma incubação de seis e de 24 horas recolheu-se e preservou-se a  $-80^{\circ}\text{C}$  o meio de cultura utilizado na incubação dos monócitos com a hemozoína. O meio de cultura de incubação com monócitos durante seis horas (mHZ6) foi incubado, directamente com novos monócitos ou foi centrifugado, de forma a remover os restos de hemozoína presentes. O meio de cultura de incubação com monócitos durante 24 horas (mHz24) foi

centrifugado de forma a remover restos de cristal ainda presentes. O mHz24 foi então incubado com novos monócitos directamente ou em proporções de 1:1, 1:4 com meio de cultura novo. As incubações duraram quatro horas.

Como se pode verificar na Figura 20 apenas o meio de cultura não centrifugado tem alguma influência na capacidade fagocítica dos monócitos.

#### 5.6.1 Comparação dos ensaios fagocíticos utilizando as bio-partículas pHrodo™ e Phagotest™

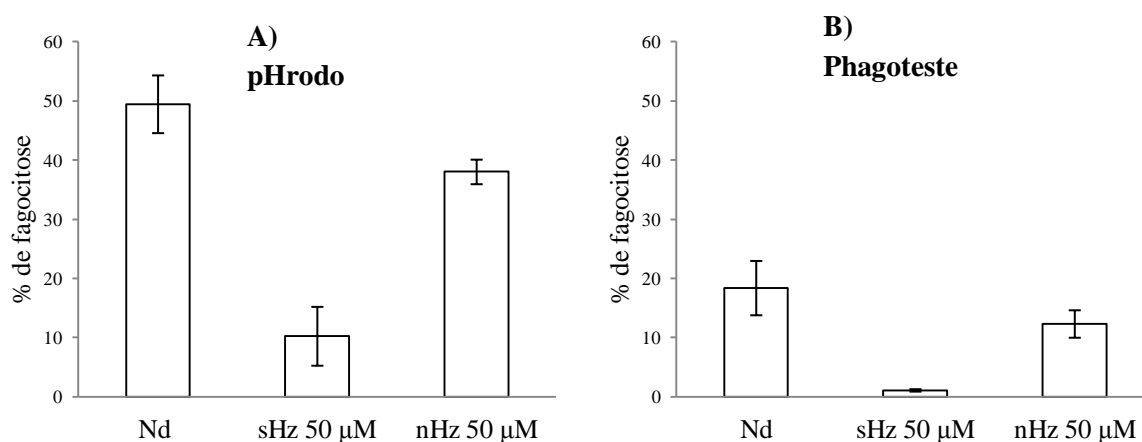
O ensaio fagocítico utilizado baseia-se na acidificação do fagossoma, uma vez que as bio-partículas só emitem fluorescência detectável em pH ácido. Assim, caso as partículas sejam ingeridas mas, se de alguma forma o fagossoma for incapaz de maturar, este ensaio de quantificação de fagocitose detectaria uma inibição na capacidade fagocítica, quando na verdade, estaríamos perante uma inibição na maturação do fagossoma. Procedeu-se então, à comparação do ensaio de quantificação de fagocitose utilizado neste trabalho, com outro ensaio cujos resultados não dependessem do pH. Escolheu-se o ensaio comercial phagoteste™ que utiliza partículas bacterianas conjugadas com FITC.



**Figura 21: Comparação dos ensaios fagocíticos pHrodo™ e Phagoteste™.** Comparação da quantificação da capacidade fagocítica através da utilização das bio-partículas pHrodo™ (painel A) e das bio-partículas phagoteste™ (painel B). Incubações de 15, 90 e 180 minutos.

Como se pode observar na Figura 21, ambas as metodologias apresentam um perfil de quantificação de fagocitose similar.

Posteriormente, incubaram-se monócitos isolados e purificados como anteriormente descrito com sHz e com nHz, durante seis horas. Após a incubação com hemozoína procedeu-se ao ensaio fagocítico (durante três horas) com as bio-partículas pHrodo™ ou com as bio-partículas phagotest™.



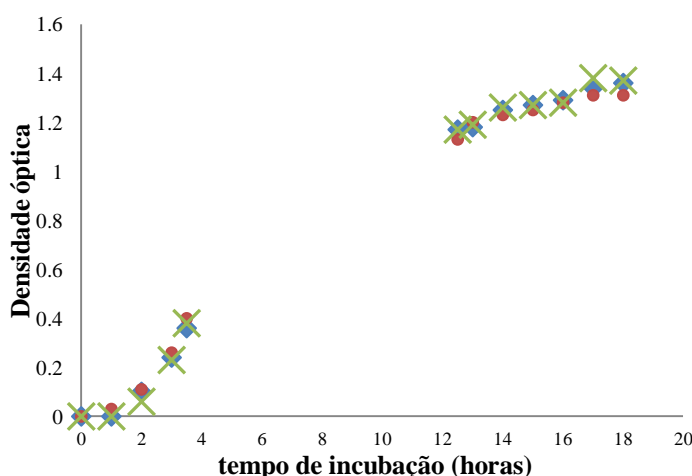
**Figura 22 Efeito da hemozoína - comparação dos ensaios fagocíticos pHrodo™ e Phagoteste™.** Comparação da quantificação da capacidade fagocítica através da utilização das bio-partículas pHrodo™ (painel A) e das bio-partículas phagoteste™ (painel B). Os monócitos foram pré-incubados com hemozoína sintética produzida no Japão (sHz), com hemozoína nativa (nHz) ou sem nada (Nd) durante seis horas.

Como se pode observar na Figura 22, ambos os ensaios apresentam tendências semelhantes, ainda que com o phagoteste™ se obtenha magnitudes de fagocitose inferiores, relativamente ao pHrodo™. Ambos os testes detectam uma inibição da capacidade fagocítica de monócitos provocada pela prévia ingestão de hemozoína sintética e, em menor escala, pela hemozoína nativa.

## 5.7 Ensaios com bactérias viáveis

### 5.7.1 Curva de crescimento de *Salmonella enterica* serótipo Typhimurium e expressão de GFP

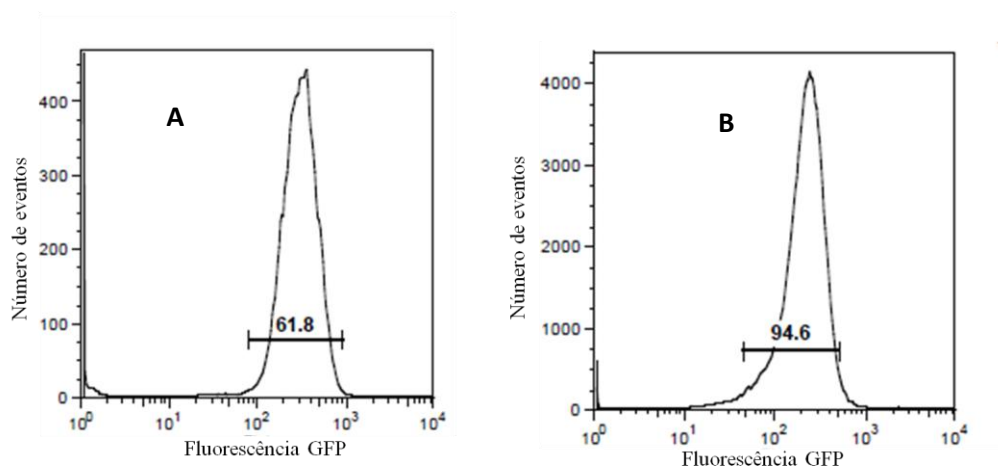
O crescimento da estirpe de *Salmonella entérica* serótipo Typhimurium utilizada neste estudo (estirpe ATCC 12023) foi monitorizado de acordo com a densidade óptica da suspensão bacteriana, ao longo do tempo. O ensaio foi realizado em meio LB com 100 µg/ mL de ampicilina, de forma a seleccionar positivamente o plasmídeo que expressa GFP (*Green Fluorescence Protein*). A expressão de GFP, ao longo do tempo, foi quantificada por citometria de fluxo.



**Figura 23** Curva de crescimento de *Samonella enterica* serótipo Tiphymurium. Densidade óptica de suspensão bacteriana em função do tempo de incubação.

A Figura 23 representa a curva de crescimento da estirpe de *Salmonella* utilizada. A curva apresenta o típico aspecto sigmoidal onde é possível observar a fase de latência (até duas horas de incubação), a fase logarítmica (entre duas e 10 horas, aproximadamente) e a fase estacionária (a partir de 10, 11 horas de incubação).

Quantificou-se a percentagem de bactérias GFP + no início e no final do crescimento (uma hora de incubação e 17 horas de incubação). Como se pode observar na Figura 24, após 17 horas de incubação, 94,6% eram GFP +.



**Figura 24: Monitorização da fluorescência de *S. enterica* por citometria de fluxo.** Comparação do sinal de fluorescência emitido pelas bactérias GFP positivas após uma (painel A) e 17 horas (painel B) de incubação.

#### 5.7.2 Optimização do tempo de incubação com gentamicina

Tomou-se partido do facto da estirpe de *S. enterica* utilizada, possuir um plasmídeo que expressa, constitutivamente, GFP para o desenvolvimento de um ensaio de quantificação da fagocitose com bactérias viáveis. De forma a detectar-se, apenas as bactérias fagocitadas, as bactérias não ingeridas foram eliminadas através da incubação com gentamicina. Este procedimento foi realizado, tanto no ensaio fagocítico como no ensaio bactericida. Neste último, é especialmente importante que apenas as bactérias ingeridas pelos monócitos sejam quantificadas, uma vez que o objectivo deste ensaio é quantificar a sobrevivência bacteriana após a fagocitose.

Assim, estabeleceu-se uma cinética de morte bacteriana, ao longo do tempo, através da incubação da suspensão bacteriana com gentamicina.

**Tabela 4: Quantificação da sobrevivência bacteriana após a incubação com gentamicina.**

|               | CFU/mL      |
|---------------|-------------|
| <b>5 min</b>  | Incontáveis |
| <b>10 min</b> | Incontáveis |
| <b>15 min</b> | 7000        |
| <b>20 min</b> | 2180        |
| <b>30 min</b> | 930         |

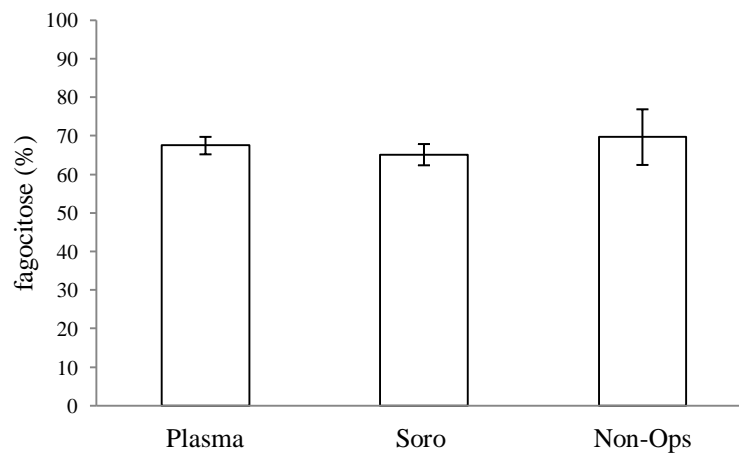
Suspensão bacteriana com uma concentração de  $1 \times 10^7$  CFU/mL foi incubada durante cinco, 10, 15 e 30 min com gentamicina a uma concentração final de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Foram inoculados em meio de cultura semi-sólido (LB-ágar com 100  $\mu\text{g/mL}$  ampicilina) 100  $\mu\text{L}$  da suspensão após a incubação com gentamicina.

Pela observação da Tabela 4 é possível verificar que a viabilidade celular, evidenciada pela capacidade de replicação em cultura, decresce com o tempo de incubação com a gentamicina. A incubação com gentamicina durante 15 minutos resulta numa perda de 99,9% das bactérias relativamente à suspensão inicial. Assim optou-se pela incubação de 15 minutos, com gentamicina nos ensaios subsequentes.

#### 5.7.3 Opsonização de bactérias

De forma a maximizar a capacidade dos monócitos de fagocitarem bactérias, foi pertinente investigar qual a influência da opsonização das bactérias. Assim, procedeu-se a um ensaio, no qual as bactérias opsonizadas com soro, plasma ou não opsonizadas, foram incubadas com monócitos, durante 30 minutos

Através da observação da Figura 25 é possível concluir que a opsonização de bactérias não aparenta influenciar a magnitude com que estas são fagocitadas pelos monócitos, pelo que, nos ensaios seguintes, se optou pela não opsonização da suspensão bacteriana.



**Figura 25: Influência da opsonização na capacidade fagocítica de monócitos.** Quantificação feita através da utilização de *S. Typhimurium* GFP positiva, opsonizadas com plasma, soro ou não opsonizadas (Non-Ops).

#### 5.7.4 Ensaio fagocítico e bactericida

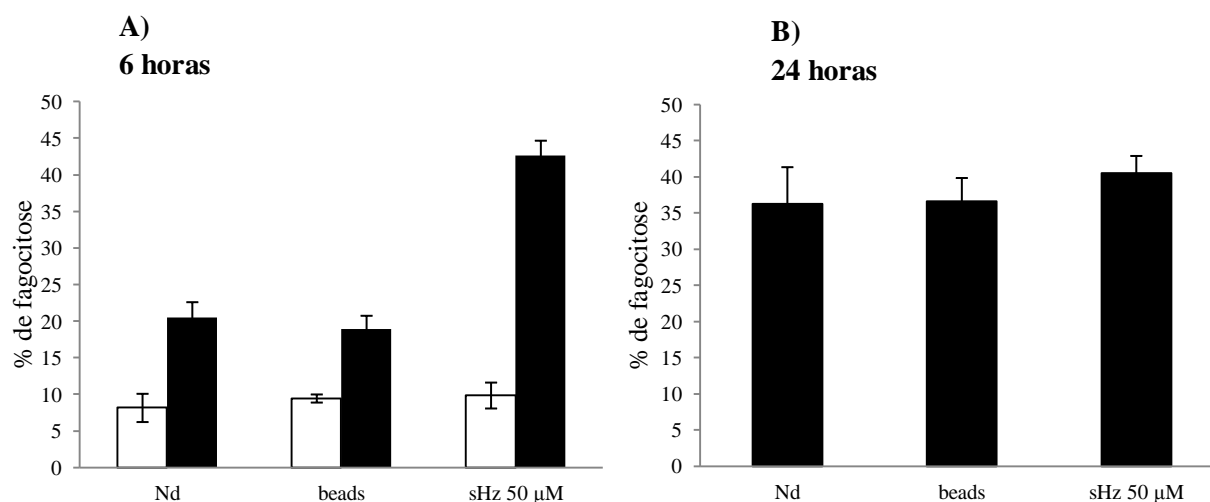
Estudou-se a influência da ingestão prévia de hemozoína na capacidade fagocítica de monócitos. Para este fim os monócitos, i foram incubados com hemozoína sintética (sHz) durante seis e 24 horas. Posteriormente, procedeu-se ao ensaio fagocítico quantificando por citometria de fluxo a percentagem de monócitos que ingeriram *S. enterica* serótipo Typhimurium GFP positiva.

A taxa de ingestão de sHz foi idêntica ao apresentado na Figura 9, sendo que, ao fim de seis e 24 horas de incubação cerca de 50% e 70% dos monócitos, respectivamente, tinham ingerido hemozoína.

Após cada tempo de incubação com sHz procedeu-se ao ensaio de quantificação da fagocitose, pela incubação com bactérias viáveis, durante 15 e 60 minutos. A análise, unicamente de bactérias fagocitadas por monócitos, foi garantida através da execução do ensaio sob a protecção de gentamicina (100 µg/mL).

Pela observação da Figura 26 é possível concluir que a pré-ingestão de hemozoína sintética não parece influenciar a capacidade dos monócitos de fagocitarem as bactérias às 24 horas de pré-incubação com a hemozoína (Figura 26, painel B). Pelo contrário, após seis horas de incubação, no ensaio fagocítico com duração de 60 minutos, são

detectadas mais bactérias GFP positivas nas amostras incubadas com o cristal, relativamente, aos controlos (barras a negro, painel A da Figura 26).

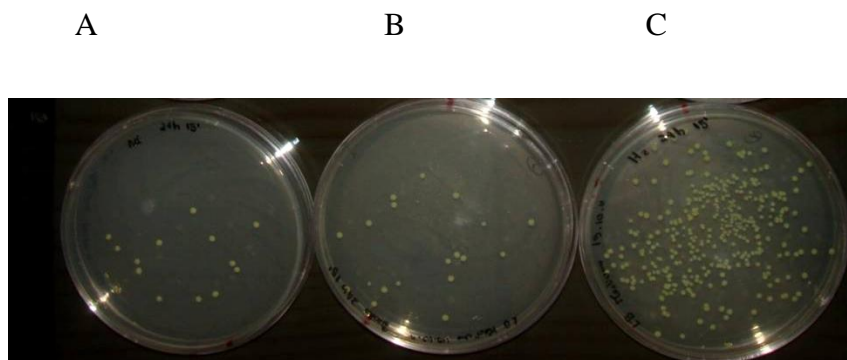


**Figura 26: Capacidade fagocítica de monócitos incubados com e sem hemozoína sintética.** A incubação com sHz durante seis (painel A) e 24 horas (painel B). As barras a branco correspondem a um ensaio fagocítico de curta duração, no qual a suspensão de *Salmonella* utilizada na quantificação da fagocitose foi incubadas durante 15 minutos com os monócitos. As barras a negro representam um ensaio fagocítico de 60 minutos.

Após a incubação de 15 e 60 minutos com as bactérias, procedeu-se ao ensaio bactericida, através da cultura em meio LB semi-sólido da suspensão bacteriana resultante da lise dos monócitos com água. Deixaram-se crescer as culturas, durante 24 horas, até ser possível observar colónias isoladas redondas, convexas e com uma cor branca amarelada. Quantificaram-se as unidades formadoras de colónias (CFU) para cada amostra. Este valor corresponde ao número de bactérias que sobreviveu no interior dos monócitos, uma vez que as restantes bactérias foram eliminadas pela gentamicina. Como se pode observar na Figura 27, as amostras cujos monócitos foram incubados com hemozoína (C) permitiram a sobrevivência de um maior número de bactérias, relativamente aos controlos (A e B). De facto, após seis e 24 horas de incubação, os ensaios bactericidas com a duração de 15 minutos, demonstram haver uma sobrevivência bacteriana de 7,2% e 16% respectivamente superior, nas amostras pré-



incubadas com hemozoína. No anexo vii encontram-se as CFU/mL obtidas para cada tempo de incubação com hemozoína e respectivos controlos.



**Figura 27: Crescimento conflente de bactérias *S. enterica* serótipo Typhimurium após o ensaio bactericida.** Ensaio bactericida de 15 minutos, com monócitos que foram previamente incubados com *Beads* de Látex (B), hemozoína sintética (produzida no Japão) (C), ou sem nada (A) durante 24 horas.

## 6. Discussão

De acordo com os objectivos deste trabalho estudou-se a influência da ingestão de hemozoína na capacidade fagocítica de monócitos e granulócitos.

Para este fim, utilizou-se o ensaio comercial pHrodo™, ao qual foram feitas diversas optimizações. O pHrodo™ é um ensaio de quantificação de fagocitose, por citometria de fluxo, que utiliza bio-partículas bacterianas (*E.coli*), marcadas com um fluorocromo que, apenas fluoresce em meio ácido. Desta forma, é possível eliminar passos de *quenching* da fluorescência das partículas não ingeridas, uma vez que as mesmas só fluorescem no interior do fagossoma devidamente acidificado. De forma a confirmar que as bio-partículas pHrodo™ não fluorescem no meio extracelular, procedeu-se a um ensaio no qual a fagocitose foi inibida pela colheita do sangue utilizando EDTA como anticoagulante. Os resultados obtidos (Figura 14) permitem concluir que, de facto, as bio-partículas utilizadas para a quantificação da fagocitose emitem sinal de fluorescência apenas quando se encontram no interior dos fagócitos.

Estudou-se a cinética da detecção da fagocitose de monócitos e granulócitos através deste ensaio, de forma a reproduzir os resultados descritos na literatura<sup>63</sup> e pHrodo™ e phagoteste™ *data sheet*). Segundo as recomendações do fabricante, após 15 minutos de incubação com as bio-partículas bacterianas pHrodo™, seria de esperar obter uma capacidade fagocítica superior a 90% para granulócitos e superior a 65% para monócitos. No entanto, os ensaios realizados demonstraram que, para se atingir estes valores, seria necessário incubar as bio-partículas com os fagócitos durante mais tempo. Nos ensaios com monócitos purificados só após 180 minutos se obteve uma capacidade fagocítica superior a 80% (Figura 13). No caso dos ensaios de sangue total foram necessários entre 30 a 90 minutos para atingir os referidos valores. No entanto, de forma a uniformizar a metodologia de quantificação de fagocitose, as bio-partículas foram

incubadas com os fagócitos durante 180 minutos, quer nos ensaios com sangue total quer nos ensaios com monócitos purificados.

Uma vez que nos ensaios com monócitos purificados seria necessário realizar diversos passos com os monócitos aderentes em placa (a purificação e a incubação com hemozoína), foi pertinente comparar o ensaio fagocítico com os monócitos aderentes ou após a sua re-suspensão. Ambas as metodologias demonstraram uma cinética de quantificação semelhante ao longo do tempo, no entanto, escolheu-se realizar o ensaio fagocítico após a ressuspensão dos monócitos. Esta escolha foi feita tendo em conta a menor destabilização dos monócitos. É necessário promover a remoção dos monócitos aderentes através de raspagem, procedimento que pode perturbar a estabilidade celular. No entanto, na metodologia na qual as bio-partículas são incubadas com os monócitos aderentes, este procedimento será realizado no final do ensaio fagocítico, imediatamente antes da marcação com anti-CD14-FITC e da análise por citometria de fluxo. No caso do ensaio, no qual as células se encontram em suspensão, a raspagem dos monócitos é feita antes da incubação com as bio-partículas, permitindo aos monócitos recuperar alguma estabilidade durante a incubação e antes da marcação com anti-CD14-FITC e da análise por citometria de fluxo.

Foi ainda comparada a cinética da fagocitose quando as bio-partículas são incubadas com monócitos numa estufa (a 37° C com uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>) ou em banho-maria. Verificou-se que ambos os suportes proporcionam a obtenção de resultados semelhantes, ao longo do tempo. No entanto, parece haver um atraso quando as amostras são incubadas na estufa. Isto acontece, provavelmente, porque em banho-maria a suspensão celular atinge a temperatura desejada mais rapidamente e de forma homogénea, em contraste com a incubação na estufa.

### **Optimização da incubação com hemozoína**

Inicialmente, incubaram-se monócitos com três concentrações de hemozoína: 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ . Estas concentrações reflectem o conteúdo hémico da hemozoína, uma vez que são obtidas através da dissolução dos cristais de hemozoína em heme. A escolha desta gama de concentrações foi feita tendo em conta o conteúdo hémico presente em 10  $\mu\text{L}$  de eritrócitos infectados (trofozoítos).<sup>110</sup> Esta gama de concentrações permite, ainda, estabelecer comparações entre este estudo e diversos estudos anteriormente realizados.<sup>87,89,111</sup>

Após a realização do ensaio de optimização da detecção de hemozoína por citometria de fluxo, no qual os monócitos foram incubados com as três concentrações de hemozoína, anteriormente referidas, durante duas, seis e 24 horas, verificou-se que para a concentração mais baixa de hemozoína (1  $\mu\text{M}$ ) não eram obtidas taxas de ingestão superiores a 10%, mesmo após 24 horas de incubação (Figura 8). Desta forma, excluiu-se a utilização de hemozoína a 1  $\mu\text{M}$  e optou-se pela utilização das duas concentrações mais elevadas nos ensaios subsequentes. Nos ensaios com sangue total foram utilizadas as mesmas concentrações de hemozoína. No entanto, nestes ensaios optou-se pela utilização de tempos de incubação com a hemozoína mais reduzidos (quatro horas), uma vez que se pretende aceder à capacidade fagocítica de granulócitos. Os granulócitos apresentam alterações de forma e tamanho quando incubados a 37° C por períodos de tempo mais longos, facto que pode dificultar a análise por citometria de fluxo (resultados não mostrados).

Estudou-se a influência da ingestão da hemozoína na viabilidade de monócitos. Como referido na secção apropriada (Figura 11) a hemozoína tem pouca influência na viabilidade celular, mesmo quando são utilizadas concentrações mais elevadas (50 $\mu\text{M}$ ). No entanto, pontualmente, verificaram-se alterações na viabilidade nos monócitos

incubados com hemozoína. Este facto poderá estar associado a factores que não são passíveis de ser controlados, como por exemplo, características intrínsecas do dador, ou o tempo entre a colheita do sangue e a realização dos ensaios.

Na grande maioria dos ensaios foi utilizada, exclusivamente, hemozoína sintética (produzida no Japão). A utilização de hemozoína nativa é restritiva devido à dificuldade e morosidade na sua obtenção. A produção de hemozoína nativa suficiente para a realização dos ensaios pretendidos demora em média 30 dias, uma vez que é necessário manter um elevado número de culturas de eritrócitos infectados por *P. falciparum* (procedimento delicado) até ser atingida uma parasitémia superior a 2,5% e, posteriormente, purificar a hemozoína a partir de *pellets* provenientes das referidas culturas.

### **Influência da ingestão de hemozoína na capacidade fagocítica**

Testou-se qual a influência da ingestão de hemozoína na subsequente fagocitose de monócitos e granulócitos. Verificou-se que a hemozoína sintética, produzida no Japão, inibe a capacidade fagocítica destas células. A magnitude desta inibição é dependente da concentração de hemozoína utilizada e do tempo de incubação dos monócitos com a hemozoína. Este facto é explicável, uma vez que a quantidade de hemozoína ingerida pelos fagócitos é, igualmente, proporcional ao tempo de incubação e à concentração de hemozoína utilizada (Figura 8).

Nos ensaios com monócitos purificados, após duas horas de incubação com 50  $\mu\text{M}$  de hemozoína sintética, é possível observar inibição na capacidade fagocítica. No entanto, nas amostras pré-incubadas com a concentração mais baixa de sHz (10  $\mu\text{M}$ ) este efeito não é tão marcado. Uma possível explicação para este facto pode ser a reduzida taxa de ingestão de sHz após duas horas de incubação, cerca de 10% (Figura 8). Assim, a

quantidade de hemozoína ingerida, não aparenta ser suficiente para afectar a capacidade fagocítica destes monócitos.

Após 24 horas de incubação, os monócitos ingeriram grandes quantidades de hemozoína, o que se poderia reflectir numa inibição da subsequente fagocitose ainda mais marcada do que se verifica após seis horas de incubação. No entanto, tal facto não se verifica. Há que ter em atenção que aqui, as células já se encontram em cultura há mais de 24 horas e, os próprios controlos, podem ter as suas funções celulares afectadas. Ainda assim, é notória a inibição causada pela hemozoína sintética a 50  $\mu\text{M}$ .

Nos ensaios com sangue total verificou-se que a hemozoína era mais avidamente ingerida por monócitos do que por granulócitos (Figura 9). Esta observação consiste numa possível explicação para o efeito inibitório da hemozoína sintética ser mais evidente em monócitos do que em granulócitos. No entanto, este facto não explica o reduzido efeito inibitório que, se verifica em fagócitos incubados com hemozoína nativa, uma vez que esta hemozoína se acumula a taxas superiores tanto em monócitos como em granulócitos (Figura 9). Uma possível explicação para esta observação reside nos resultados obtidos por espectroscopia electrónica de varrimento (SEM), que indicam que a hemozoína sintética, produzida no Japão, é maior do que a hemozoína nativa. De facto, efeitos imunológicos diferentes, associados a cristais de hemozoína com tamanhos diferentes, foram descritos por Martel *et al.* <sup>92</sup>.

Na literatura foi por diversas vezes apontado que, a hemozoína, por si só, seria inerte <sup>91</sup>. Uma possível contaminação com ADN ou com proteínas seria responsável pelos efeitos imunológicos observados nos diversos estudos. No presente estudo verificou-se que a hemozoína sintética, produzida no Japão (não contaminada com ADN ou com proteínas), produzia um efeito mais pronunciado sobre os fagócitos que a hemozoína nativa. A hemozoína nativa revelou ter contaminantes proteicos. Desta forma, este

estudo demonstra que a associação de hemozoína com proteínas não é responsável pelo seu efeito inibitório na capacidade fagocítica de monócitos e granulócitos.

Os contaminantes proteicos observados na hemozoína nativa, são, provavelmente, provenientes do parasita, uma vez que esta é obtida por purificação de culturas de *P.falciparum*. O processo de purificação da hemozoína nativa envolve um passo de degradação de proteínas agregadas através da adição de proteinase K, cuja função é clivar as ligações peptídicas (anexo i). Pode-se concluir que este passo não está a ser eficiente e será necessário proceder a alguns ajustes na metodologia, nomeadamente, prolongar a incubação com proteinase K.

A título comparativo foi utilizada hemozoína sintética produzida no IMM. Esta hemozoína foi produzida pela mesma metodologia de cristalização rápida (catálise ácida, método de Slater com algumas modificações, ver anexo ii) que a hemozoína produzida no Japão. No entanto, os resultados de SEM demonstraram que, os cristais de hemozoína sintética produzida no IMM teriam dimensões mais reduzidas que os cristais de hemozoína produzida no Japão. A hemozoína sintética produzida no IMM apresentou dimensões idênticas à hemozoína nativa. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Martel e os seu colaboradores, que referem que o método de produção de hemozoína através de catálise ácida, quando devidamente controladas determinadas condições reacionais, origina cristais morfológica e, dimensionalmente, idênticos aos cristais de hemozoína nativa. Pelo contrário, as dimensões apresentadas pela hemozoína sintética produzida no Japão, são superiores ao esperado uma vez que se utilizou a mesma metodologia de cristalização rápida, referida anteriormente. Estes cristais são morfológicamente idênticos aos que se produziram no IMM, no entanto, apresentam um tamanho de cerca de 5  $\mu\text{m}$  por cristal, mais compatível com a metodologia de produção de hemozoína sintética denominada de catálise básica

anidra<sup>92</sup>. Como mencionado no caso da hemozoína nativa, diferenças dimensionais nos cristais de hemozoína podem estar associados a diferentes efeitos imunológicos<sup>92</sup>. Este facto pode ser a explicação para a reduzida inibição da capacidade fagocítica observada em monócitos incubados com a hemozoína produzida no IMM. No entanto, nos ensaios com esta hemozoína foram utilizadas doses mais baixas do que nos ensaios com hemozoína sintética produzida no Japão, o que dificulta a inferência de conclusões sobre o efeito comparativo das duas hemozoínas. Desta forma, seria necessário realizar ensaios com ambas as hemozoínas em paralelo, em doses comparáveis.

### **Diferenças na capacidade fagocítica de monócitos e granulócitos que ingeriram, ou não, hemozoína**

Investigou-se se a capacidade fagocítica de monócitos e granulócitos que ingeriram ou não hemozoína seria diferente (Hz positiva e Hz negativa, respectivamente). Pelas tabelas 2 e 3 verifica-se uma discrepância entre os ensaios com monócitos purificados e os ensaios com sangue total. Nos ensaios com monócitos purificados a população Hz positiva aparenta fagocitar mais que a população Hz negativa. Esta observação poderia significar que os monócitos que ingeriram hemozoína poderiam estar a libertar alguma molécula/ substância que sinalizasse uma inibição dos fagócitos que se encontrassem na proximidade. No entanto, quando o meio de cultura utilizado na incubação de monócitos com hemozoína foi testado, apenas o meio não centrifugado, ou seja, o meio que continha restos não ingeridos de hemozoína evidenciou um efeito sob a capacidade fagocítica de monócitos. Estes resultados apontam para que a hemozoína, e não algo segregado pelas células que ingeriram hemozoína, esteja a influenciar a capacidade fagocítica de monócitos. De facto, a análise das populações Hz positivas e Hz negativas nos ensaios de sangue total vai ao encontro desta afirmação, uma vez que se verifica que as células que ingeriram hemozoína (Hz positivas) apresentam uma capacidade fagocítica inferior às que não ingeriram hemozoína (Tabela 3). A diferença entre a



capacidade fagocítica de fagócitos Hz positivos e Hz negativos aparenta ser mais “forte” no caso dos ensaios com sangue total, uma vez que a diferença entre estas duas populações é mais demarcada, não havendo sobreposição entre as respectivas barras de erro (resultados não mostrados).

#### **A hemozoína inibe a fagocitose e não a acidificação do fagossoma**

Uma vez que o ensaio de quantificação da fagocitose utilizado se baseia na acidificação do fagossoma, sendo que as bio-partículas de quantificação só fluorescem no interior do fagossoma devidamente acidificado, ponderou-se se a inibição observada na capacidade fagocítica de monócitos e granulócitos incubados com hemozoína seria de facto uma inibição da maturação do fagossoma. Para este efeito, procedeu-se à comparação com outro ensaio de quantificação cujo princípio de acção não estivesse relacionado com a acidificação do fagossoma, o Phagotest™. Ambos os testes detectam uma inibição da capacidade fagocítica de monócitos incubados com hemozoína. Mais uma vez este efeito é mais pronunciado com sHz do que com a nHz, ainda que esta pareça causar algum efeito. Uma vez que os resultados obtidos pelas duas metodologias de quantificação são semelhantes, é possível afirmar que a hemozoína sintética e aparentemente a nativa (ainda que numa magnitude inferior) provocam um efeito inibitório da fagocitose subsequente e não na maturação do fagossoma.

Como forma de corroborar os resultados obtidos por citometria de fluxo, os ensaios descritos poderão ser monitorizados através de microscopia de fluorescência. Desta forma, será possível confirmar se de facto os fagócitos que ingeriram hemozoína são posteriormente incapazes de fagocitar. Uma vez que as bio-partículas pHrodo™ apresentam diferenças na intensidade de fluorescência consoante o pH do meio em que se encontram, será possível confirmar se de facto a hemozoína não inibe a maturação do fagossoma e que os fagócitos que contêm duplamente hemozoína e bio-partículas

pHrodo™ apresentam a mesma intensidade de fluorescência que os fagócitos que só ingeriram bio-partículas pHrodo™. Poderá, ainda, dar-se o caso de as bio-partículas pHrodo™ serem ingeridas, mas que uma inibição da maturação do fagossoma provocada pela hemozoína, impeça a sua acidificação e origine um sinal de fluorescência inferior não detectável nos ensaios de citometria de fluxo. No entanto, uma vez que se utilizou bio-partículas de quantificação de fagocitose não dependentes da acidificação do fagossoma (Phagotest™), não se esperará obter tais resultados por microscopia. Uma comparação com amostras controlo, as quais não foram incubadas com hemozoína, possibilitará corroborar a hipótese de que a hemozoína afecta a capacidade fagocítica da totalidade dos fagócitos das amostras em que foi incubada. No entanto, a utilização de microscopia de fluorescência não deverá ser capaz de explicar o porquê desta inibição geral observada nos fagócitos incubados com hemozoína.

Apesar de ser possível analisar a intensidade de fluorescência por citometria de fluxo, caso a bio-partícula ingerida apresente uma intensidade de fluorescência inferior ao limiar estabelecido (a partir do qual se definiu que a célula estivesse a fagocitar), não será detectada como estando efectivamente no interior do fagócito. No entanto, por microscopia, deverá ser possível determinar, visualmente, se a bio-partícula pHrodo™ se encontra no interior do fagócito, ainda que apresente uma intensidade de fluorescência inferior.

### **Ensaaios com bactérias viáveis**

Nos ensaios com bactérias viáveis utilizou-se uma estirpe da *Salmonella enterica* serótipo Typhimurium que expressa GFP como forma de quantificar a capacidade fagocítica e bactericida de monócitos.

Contrariamente ao que se observou nos ensaios com bio-partículas bacterianas, verificou-se que a hemozoína não influencia a capacidade dos monócitos de fagocitarem

bactérias. Pelo contrário, após seis horas de incubação, no ensaio fagocítico com duração de 60 minutos, observa-se uma maior capacidade fagocítica por parte dos monócitos previamente incubados com hemozoína, relativamente aos controlos. Uma explicação para estes resultados será possível através da realização de diversas experiências de monitorização da fagocitose utilizando diferentes quantidades de bactérias. De notar que neste ensaio utilizaram-se, erradamente, 400 bactérias por cada monócito. Esta proporção bactérias/ monócitos pode ser demasiado elevada o que poderá levar a que os monócitos, com ou sem hemozoína, sejam forçados a fagocitar as bactérias. No entanto, a proporção bactérias/ monócitos utilizada não explica a possível activação na fagocitose que parece ocorrer nas amostras com hemozoína, após seis horas de incubação.

Realizou-se um ensaio bactericida no qual se acedeu à sobrevivência bacteriana no interior de monócitos previamente incubados com ou sem hemozoína. Através deste ensaio, observou-se uma maior sobrevivência bacteriana nas amostras em que os monócitos foram incubados com hemozoína. Uma vez que por citometria de fluxo se verificou que a capacidade fagocítica dos monócitos incubados com hemozoína seria igual ou superior à dos monócitos das amostras controlo, é possível concluir que a hemozoína afecta a capacidade dos monócitos eliminarem as bactérias, aumentando assim, a sua sobrevivência intra-celular. A explicação para este facto poderá estar associada com a acidificação do fagossoma, uma vez que a sobrevivência e replicação intra-celular da *Salmonella* é dependente deste processo<sup>53</sup>.

Desta forma, a realização de ensaios de microscopia de fluorescência como forma de monitorizar a acidificação dos fagossomas contendo hemozoína, será preponderante para a inferência de conclusões válidas sobre a razão pela qual a hemozoína aumenta a

sobrevivência de *Salmonella*. Poder-se-á tomar partido das bio-partículas pHrodo™ para este fim, tal como referido anteriormente.

Estudos de co-infecção de *Salmonella* e plasmódio, utilizando o modelo murino, observaram que os animais previamente infectados com plasmódio demonstravam maior predisposição para a disseminação da infecção bacteriana <sup>22</sup>. Como referido na secção apropriada, os autores procuravam estabelecer uma relação entre a hemólise e a disseminação da infecção, tendo no entanto concluído que, embora a hemólise influencie esta predisposição, deverão existir outros factores, específicos da infecção por plasmódio. No presente estudo procurou-se estabelecer um modelo *in-vitro* para entender se a hemozoína poderia ser o factor específico da infecção por plasmódio responsável pela predisposição para a disseminação de infecções bacterianas apresentada pelos doentes com malária. Apesar dos resultados obtidos demonstrarem que, de facto, a hemozoína poderá ter influência, na medida em que os fagócitos incubados com hemozoína têm as suas funcionalidades diminuídas, será necessário prosseguir com esta linha de investigação. A realização de estudos com o modelo murino, nos quais os animais serão sujeitos à exposição com hemozoína, permitindo aos fagócitos ingeri-la, e posteriormente infectados com *Salmonella*, poderá proporcionar um melhor esclarecimento no verdadeiro papel da hemozoína.

Dever-se-á ainda, proceder a um estudo molecular sistemático para melhor se compreender as interacções entre a hemozoína e os fagócitos, nomeadamente a forma como é internalizada e como se processa a inibição das funções dos referidos fagócitos. Desta forma, poder-se-á igualmente compreender de que forma a hemozoína facilita a sobrevivência intra-celular de bactérias.

## **A investigação da imunomodulação da hemozoína**

Através do estudo realizado é possível compreender as dificuldades no âmbito da investigação dos efeitos imunológicos da hemozoína. Nos últimos anos, têm sido alvo de discussão as diversas ambiguidades verificadas nos diferentes estudos imunológicos, que procuram entender qual o efeito da hemozoína na imunopatologia da malária. Como se pode verificar pelos resultados obtidos neste estudo, foi possível observar efeitos distintos associados a diferentes tipos de hemozoína, dentro do mesmo trabalho, utilizando as mesmas metodologias e, em determinados ensaios, o mesmo dador. A hemozoína sintética produzida no Japão, utilizada maioritariamente neste trabalho, foi utilizada por Coban e os seus colaboradores em diversos estudos já publicados. Contrariamente ao que se obteve neste estudo, no qual a hemozoína sintética aparenta produzir um efeito imunossupressor sobre os fagócitos, nos estudos publicados pelos nossos colaboradores a mesma hemozoína apresenta um efeito activador do sistema imunitário. Os autores descrevem que a hemozoína sintética provoca a activação da imunidade inata por um mecanismo dependente de TLR9 <sup>89</sup> e produz uma forte resposta face a antígenos específicos, podendo, desta forma, ser um potencial adjuvante para vacinas contra a malária <sup>89</sup>.

Um outro estudo, recentemente publicado, afirma que a hemozoína não é ingerida por granulócitos mas sim os vacúolos digestivos do parasita, nos quais a hemozoína é formada <sup>98</sup>. No presente estudo, bem como em outros trabalhos já publicados <sup>97</sup>, foi demonstrado claramente que, a hemozoína sintética e nativa (purificada, sem os referidos vacúolos) são ingeridas por granulócitos. Interessantemente, neste estudo, os autores relatam que granulócitos previamente incubados com os vacúolos com hemozoína são capazes de fagocitar bactérias, no entanto revelaram uma capacidade bactericida comprometida. Estas observações estão de acordo com as do presente

estudo. Dasari e os colaboradores utilizaram, igualmente, *Salmonella entérica* serótipo Typhimurium. Foi ainda, utilizado pelos autores, o modelo clássico de estudos de fagocitose, *Staphylococcus aureus*, como forma de corroborar os resultados obtidos com *Salmonella* <sup>98</sup>.

De forma a compreender qual a verdadeira função da hemozoína na imunopatologia da malária será necessário estabelecer equipas multidisciplinares. O estudo da hemozoína aborda áreas de investigação distintas e os problemas com que os investigadores se deparam estão, por vezes, fora do âmbito da sua área de especialização. Uma correcta abordagem desses problemas requer uma estrita cooperação entre médicos, biólogos e imunologistas que compreendem a patologia associada e químicos, engenheiros de materiais e físicos que compreendem o processo de síntese e formação do cristal de hemozoína.

## **7. Conclusão**

Sabe-se que os doentes com malária têm maior predisposição para infecções bacterianas disseminadas: No entanto, as causas para esta predisposição não estão, ainda, esclarecidas. A identificação de factores específicos da infecção por plasmódio, responsáveis por esta susceptibilidade, é de extrema importância. Uma vez que os fagócitos constituem a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos externos, caso as suas funções fagocíticas e bactericidas estejam comprometidas, pode resultar numa disseminação da infecção bacteriana. No presente estudo verificou-se que a hemozoína afecta as funções fagocíticas de monócitos e de granulócitos. Nos ensaios com bactérias viáveis, foi ainda possível verificar que a capacidade bactericida dos fagócitos, previamente incubados com hemozoína, se encontrava reduzida, resultando numa maior sobrevivência bacteriana. Este trabalho sugere que a hemozoína possa ser um factor específico da infecção por plasmódio, responsável pela predisposição que estes doentes apresentam para disseminação de infecções bacterianas, uma vez que condiciona a função fagocítica e bactericida de monócitos e de granulócitos.

De uma forma geral, este trabalho contribui para o melhor entendimento da função da hemozoína na imunopatologia da infecção por plasmódio e as suas interacções com o sistema imunitário.

## 8. Bibliografia

1. Cox FEG. History of Human parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(4):595-612.
2. Harrison GA. *Mosquitoes, malaria, and man: a history of the hostilities since 1880*. 1st ed. New York: Dutton; 1978:314.
3. World Health Organization. *World Malaria Report 2011*. Geneva; 2011:73-75.
4. Roca-Feltre A, Kwizombe CJ, Sanjoaquin MA, et al. Lack of decline in childhood malaria, Malawi, 2001-2010. *Emerging Infectious Diseases*. 2012;18(2):272-278.
5. Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, et al. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The Lancet*. 2012;379(9814):413-431.
6. Singh B, Daneshvar C. *Plasmodium knowlesi* malaria in Malaysia. *Medical Journal of Malaysia*. 2010;65(3):224-230.
7. Rogers WO. *Plasmodium and Babesia in Manual of Clinical Microbiology, volume 2*. 8th ed. (Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC, eds.). Washington: ASM Press; 2003:1944-1960.
8. Gosling PJ. *Dictionary of Parasitology*. London: Taylor & Francis Group; 2005:408.
9. Center of Diseases Control. *Anopheles Mosquitoes*. 2010. Available at: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>. Accessed February 20, 2012.
10. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(4):1266-1276.
11. Berkley JA, Lowe BS, Mwangi I, et al. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *The New England Journal of Medicine*. 2005;352(1):39-47.
12. Zucker JR, Lackritz EM, Ruebush TK, et al. Childhood mortality during and after hospitalization in western Kenya: effect of malaria treatment regimens. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996;55(6):655-660.
13. Reddy EA, Shaw AV, Crump JA. Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2010;10(6):417-432.
14. Morpeth SC, Ramadhani HO, John A. Invasive non-Typhi *Salmonella* disease in Africa. *Clinical Infectious Diseases*. 2010;49(4):606-611.
15. Bahwere P, Levy J, Hennart P, et al. Community-acquired bacteremia among hospitalized children in rural central Africa. *International Journal of Infectious Diseases*. 2001;5(4):180-188.



16. Idoko JA, Lawande RV, Mohammed I. A prospective study of septicaemia in Zaria, northern Nigeria. *East African Medical Journal*. 1986;63(8):515-521.
17. Crump JA, Griffin PM, Angulo FJ. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;35(7):859-865.
18. Sigauque B, Roca A, Mandomando I, et al. Community-acquired bacteremia among children admitted to a rural hospital in Mozambique. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2009;28(2):108-113.
19. Mackenzie G, Ceesay SJ, Hill PC, et al. A decline in the incidence of invasive non-typhoidal *Salmonella* infection in The Gambia temporally associated with a decline in malaria infection. *PloS one*. 2010;5(5):e10568.
20. Mabey DC, Brown A, Greenwood BM. *Plasmodium falciparum* malaria and *Salmonella* infections in Gambian children. *The Journal of Infectious Diseases*. 1987;155(6):1319-1321.
21. Gill FA, Kaye D, Hook EW. The influence of erythrophagocytosis on the interaction of macrophages and *Salmonella* In vitro. *The Journal of Experimental Medicine*. 1966;124(2):173-183.
22. Roux CM, Butler BP, Chau JY, et al. Both hemolytic anemia and malaria parasite-specific factors increase susceptibility to nontyphoidal *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *Infection and Immunity*. 2010;78(4):1520-1527.
23. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Kuby Immunology*. 4th ed. (Folchettii N, ed.). New York: W.H. Freeman and Company; 2000:41-45.
24. Rabinovitch M. Professional and non-professional phagocytes : an introduction. *Trends in Cell Biology*. 1995;5(3):85-87.
25. Steinberg BE, Grinstein S. Pathogen destruction versus intracellular survival : the role of lipids as phagosomal fate determinants. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(6):2002-2011.
26. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology*. 2005;23:975-1028.
27. Lynn WA. Mechanisms and detection of bacteraemia. *Journal of the Royal College of Physicians of London*. 2000;34(6):536-540.
28. Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *The New England Journal of Medicine*. 2000;343(23):1703-1714.
29. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*. 1999;17:593-623.

30. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual Review of Immunology*. 2002;20:825-852.
31. Tjelle TE, Lovdal T, Berg T. Phagosome dynamics and function. *BioEssays*. 2000;22(3):255-263.
32. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annual Review of Immunology*. 2001;19(1):275-290.
33. Daëron M. Fc Receptor biology. *Annual Review of Immunology*. 1997;15:203-234.
34. Carroll MC. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annual Review of Immunology*. 1998;16:545-568.
35. Sengeløv H. Complement receptors in neutrophils. *Critical Reviews in Immunology*. 1995;15(2):107-131.
36. Brown EJ. Complement receptors and phagocytosis. *Current Opinion in Immunology*. 1991;3(1):76-82.
37. Ghiran I, Barbashov SF, Klickstein LB, et al. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000;192(12):1797-1808.
38. Wright SD, Griffin M. Activation phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*. 1985;38(2):327-339.
39. Wright SD, Craigmyle LS, Silverstein SC. Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b and C3bi-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1983;158(4):1338-1343.
40. Ezekowitz AB, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the Human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis in yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1990;172(6):1785-1794.
41. Stahl PD, Ezekowitz R a. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current Opinion in Immunology*. 1998;10(1):50-55.
42. Campanero MR, Pulido R, Alonso JL, et al. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *European Journal of Immunology*. 1991;21(2):431-437.
43. Yamamoto Y, Klein TW, Friedman H. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. *Infection and Immunity*. 1997;65(3):1077-1082.

44. Shibata Y, Metzger WJ, Myrvik QN. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. *The Journal of Immunology*. 1997;159(5):2462-2467.
45. Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochemical Journal*. 2002;704(pt3):689-704.
46. Kinchen JM, Ravichandran KS. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2008;9(10):781-795.
47. Pitt A, Mayorga LS, Stahl PD, Schwartz a L. Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *The Journal of Clinical Investigation*. 1992;90(5):1978-1983.
48. Steinberg BE, Huynh KK, Grinstein S. Phagosomal acidification: measurement, manipulation and functional consequences. *Biochemical Society Transactions*. 2007;35(Pt 5):1083-1087.
49. Malik-Kale P, Jolly CE, Lathrop S, et al. *Salmonella* - at home in the host cell. *Frontiers in Microbiology*. 2011;2:125.
50. Ohl ME, Miller SI. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*. 2001;52:259-274.
51. Tridandapani S, Lyden TW, Smith JL, et al. The adapter protein LAT enhances fcgamma receptor-mediated signal transduction in myeloid cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(27):20480-20487.
52. Rathman M, Barker LP, Falkow S. The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infection and Immunity*. 1997;65(4):1475-1485.
53. Rathman M, Sjaastad MD, Falkow S. Acidification of Phagosomes Containing *Salmonella typhimurium* in Murine Macrophages. *Infection and Immunity*. 1996;64(7):2765-2773.
54. Oh YK, Alpuche-Aranda C, Berthiaume E, et al. Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*. 1996;64(9):3877-3883.
55. Marlovits TC, Stebbins CE. Type III secretion systems shape up as they ship out. *Current Opinion in Microbiology*. 2010;13(1):47-52.
56. Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, et al. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*. 2000;287(5458):1655-1658.
57. Bicker H, Höflich C, Wolk K, et al. A simple assay to measure phagocytosis of live bacteria. *Clinical Chemistry*. 2008;54(5):911-915.

58. Vergne I, Constant P, Lan  elle G. Phagosomal pH determination by dual fluorescence flow cytometry. *Analytical Biochemistry*. 1998;255(1):127-132.
59. Harvath L, Terle DA. Assay for Phagocytosis. *Methods in Molecular Biology*. 1999;115:281-290.
60. Ogawa M, Kosaka N, Regino CAS, et al. High sensitivity detection of cancer in vivo using a dual-controlled activation fluorescent imaging probe based on H-dimer formation and pH activation. *Molecular BioSystems*. 2010;6(5):888-893.
61. Miksa M, Komura H, Wu R, Shah GK, Wang P. A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *Journal of Immunology*. 2010;342(516):71-77.
62. Khedmat S, Hadjati J, Irvani A, Nourizadeh M. Effects of enamel matrix derivative on the viability, cytokine secretion, and phagocytic activity of human monocytes. *Journal of Endodontics*. 2010;36(6):1000-1003.
63. Shalekoff S, Tiemessen CT, Gray CM, Martin DJ. Depressed phagocytosis and oxidative burst in polymorphonuclear leukocytes from individuals with pulmonary tuberculosis with or without human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1998;5(1):41-44.
64. Cunningham AJ, Souza JB de, Walther R-M, Riley EM. Malaria impairs resistance to *Salmonella* bacteremia through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization. *Nature Medicine*. 2011;18(1):120-127.
65. Hampton MB, Winterbourn CC. Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*. 1999;232(1-2):15-22.
66. Riber U, Lind P. Interaction between *Salmonella typhimurium* and phagocytic cells in pigs. Phagocytosis, oxidative burst and killing in polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1999;67(3):259-70.
67. Sullivan D. *Hemozoin: a Biocrystal Synthesized during the Degradation of Hemoglobin in Miscellaneous biopolymers, biodegradation of synthetic polymers, vol. 9.* (Matsumura S, Steinb  chel A, eds.). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2002:129-163.
68. H  nscheid T, Egan TJ, Grobusch MP. Haemozoin : from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool, and immune modulator. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007;7(10):675-685.
69. Slater AF, Swiggard WJ, Orton BR, et al. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(2):325-9.
70. Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*. 2000;404(6775):307-310.

71. Sullivan DJ. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *International Journal for Parasitology*. 2002;32(13):1645-1653.
72. Pisciotto JM, Coppens I, Tripathi AK, et al. The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* haem crystallization. *The Biochemical Journal*. 2007;402(1):197-204.
73. Fitch CD, Cai GZ, Chen YF, Shoemaker JD. Involvement of lipids in ferriprotoporphyrin IX polymerization in malaria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999;1454(1):31-37.
74. Shio MT, Kassa FA, Bellemare M-J, Olivier M. Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. *Microbes and Infection*. 2010;12(12-13):889-899.
75. Day NP, Pham TD, Phan TL, et al. Clearance kinetics of parasites and pigment-containing leukocytes in severe malaria. *Blood*. 1996;88(12):4694-4700.
76. Frita R, Carapau D, Mota MM, Hänscheid T. In vivo hemozoin kinetics after clearance of *Plasmodium berghei* infection in mice. *Malaria Research and Treatment*. 2012;(in press).
77. Nguyen PH, Day N, Pram TD, Ferguson DJ, White NJ. Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995;89(2):200-204.
78. Sullivan DJ, Gluzman IY, Russell DG, Goldberg DE. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(21):11865-11870.
79. Fiori PL, Rappelli P, Mirkarimi SN, et al. Reduced microbicidal and anti-tumour activities of human monocytes after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Parasite Immunology*. 1993;15(12):647-655.
80. Schwarzer E, Turrini F, Ulliers D, et al. Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *The Journal of Experimental Medicine*. 1992;176(4):1033-41.
81. Giribaldi G, Ulliers D, Schwarzer E, et al. Hemozoin- and 4-hydroxynonenal-mediated inhibition of erythropoiesis. Possible role in malarial dyserythropoiesis and anemia. *Haematologica*. 2004;89(4):492-493.
82. Kremsner PG, Valim C, Missinou MA, et al. Prognostic value of circulating pigmented cells in African children with malaria. *The Journal of Infectious Diseases*. 2009;199(1):142-150.
83. Schwarzer E, Ludwig P, Valente E, Arese P. 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), a product of arachidonic acid peroxidation, is an active component of hemozoin toxicity to monocytes. *Parassitologia*. 1999;41(1-3):199-202.

84. Skorokhod OA, Alessio M, Mordmüller B, Arese P, Schwarzer E. Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *The Journal of Immunology*. 2004;173(6):4066-4074.
85. Schwarzer E, Alessio M, Ulliers D, Arese P. Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. *Infection and Immunity*. 1998;66(4):1601-1606.
86. Skorokhod OA, Alessio M, Arese P, Schwarzer E. Effect PP-activated R-. Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *Journal of Immunology*. 2004;173(6):4066-4074.
87. Millington OR, Lorenzo CD, Phillips RS, Brewer JM. Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during *Plasmodium* infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. *Journal of Biology*. 2006;5(2):5.
88. Keller CC, Davenport GC, Dickman KR, et al. Suppression of prostaglandin E2 by malaria parasite products and antipyretics promotes overproduction of tumor necrosis factor-alpha: association with the pathogenesis of childhood malarial anemia. *The Journal of Infectious Diseases*. 2006;193(10):1384-1393.
89. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005;201(1):19-25.
90. Coban C, Yagi M, Ohata K, et al. The malarial metabolite hemozoin and its potential use as a vaccine adjuvant. *Allergology International : Official Journal of the Japanese Society of Allergology*. 2010;59(2):115-124.
91. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(6):1919-1924.
92. Martel C, Shio MT, Paulina A, et al. Synthetic *Plasmodium*-like hemozoin activates the immune response : a morphology - function study. *PloS one*. 2009;4(9):e6957.
93. Wu X, Gowda NM, Kumar S, Gowda DC. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. *Journal of Immunology*. 2010;184(8):4338-4348.
94. Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature*. 1999;400(6739):73-77.
95. Jaramillo M, Plante I, Ouellet N, et al. Hemozoin-inducible proinflammatory events in vivo: potential role in malaria infection. *Journal of Immunology*. 2004;172(5):3101-3110.

96. Cambos M, Bazinet S, Abed E, et al. The IL-12p70/IL-10 interplay is differentially regulated by free heme and hemozoin in murine bone-marrow-derived macrophages. *International Journal for Parasitology*. 2010;40(9):1003-1012.
97. Frita R, Rebelo M, Pamplona A, et al. Simple flow cytometric detection of haemozoin containing leukocytes and erythrocytes for research on diagnosis, immunology and drug sensitivity testing. *Malaria Journal*. 2011;10:74.
98. Dasari P, Reiss K, Lingelbach K, et al. Digestive vacuoles of *Plasmodium falciparum* are selectively phagocytosed by and impair killing function of polymorphonuclear leukocytes. *Blood*. 2011;118(18):4946-4956.
99. Shapiro H. *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2003:734.
100. Álvarez-Barrientos A, Arroyo J, Cantón R, Nombela C, Sánchez-Pérez M. Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000;13(2):167-195.
101. Strunnikova NV, Barb J, Sergeev YV, et al. Loss-of-function mutations in Rab escort protein 1 (REP-1) affect intracellular transport in fibroblasts and monocytes of choroideremia patients. *PloS one*. 2009;4(12):e8402.
102. Winson MK, Davey HM. Flow cytometric analysis of microorganisms. *Methods*. 2000;21(3):231-240.
103. Schreiner L, Huber-Lang M, Weiss ME, et al. Phagocytosis and digestion of pH-sensitive fluorescent dye (Eos-FP) transfected *E. coli* in whole blood assays from patients with severe sepsis and septic shock. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2011;5(2):135-144.
104. Mendelow BV, Lyons C, Nhlangothi P, et al. Automated malaria detection by depolarization of laser light. *British Journal of Haematology*. 1999;104(3):499-503.
105. de Grooth BG, Terstappen LW, Puppels GJ, Greve J. Light-scattering polarization measurements as a new parameter in flow cytometry. *Cytometry*. 1987;8(6):539-544.
106. Hänscheid T, Valadas E, Grobusch MP. Automated malaria diagnosis using pigment detection. *Parasitology Today*. 2000;16(12):549-551.
107. Hänscheid T, Melo-Cristino J, Pinto BG. Automated detection of malaria pigment in white blood cells for the diagnosis of malaria in Portugal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;64(5-6):290-292.
108. Hänscheid T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clinical and Laboratory Haematology*. 1999;21(4):235-245.
109. PARTEC. CyFlow SL ® Microbiology - Detection and Analysis of Microorganisms and Small Particles. *PARTEC*. 2003:8. Available at: [http://www.partec.com/fileadmin/media/pdf/CyFlowSL\\_Microbiology.pdf](http://www.partec.com/fileadmin/media/pdf/CyFlowSL_Microbiology.pdf). Accessed February 20, 2012.

110. Schwarzer E, Bellomo G, Giribaldi G, Ulliers D, Arese P. Phagocytosis of malarial pigment haemozoin by human monocytes: a confocal microscopy study. *Parasitology*. 2001;123(Pt 2):125-131.
111. Coban C, Ishii KJ, Sullivan DJ, Kumar N. Purified malaria pigment (hemozoin) enhances dendritic cell maturation and modulates the isotype of antibodies induced by a DNA vaccine. *Infection and Immunity*. 2002;70(7):3939-3943.



## 9. Anexos

### Anexo i - Purificação de hemozoína nativa

Os *pellets* provenientes das culturas de *Plasmodium falciparum*, foram diluídos (1:2) em saponina 1% (m/v) (Sigma,) e centrifugados a 4000 RPM durante 15 minutos. Após descartar o sobrenadante, os *pellets* foram distribuídos por micro-tubos de 1,5 mL e lavados 3 a 5 vezes com PBS. Seguiu-se uma incubação de 5 minutos no banho ultra-sónico, e 7 a 8 lavagens em SDS 2%. Foi feita uma incubação *Over night* com 2 mg/mL de Proteinase K (Promega – Califórnia, EUA) (preparada numa solução tampão de Tris-HCl (10 mM), SDS (0,5 %) e CaCl<sub>2</sub> (Sigma, Sintra, Portugal) (1 mM) a pH 8) de forma a digerir os resíduos proteicos que pudessem estar associados à hemozoína.

No dia seguinte, lavou-se novamente com SDS (Sigma, Sintra, Portugal) (2 %), 3 vezes, seguindo-se uma incubação de 3 horas com ureia (Sigma, Sintra, Portugal) (6M) com agitação. Após a incubação com ureia, a hemozoína foi lavada 3 a 5 vezes com água tipo II. No final das lavagens procedeu-se a uma incubação de 5 minutos no banho ultra-sónico. A hemozoína obtida foi armazenada a 4°C para posteriormente ser quantificada e submetida a testes de pureza e qualidade.

## **Anexo ii - Síntese de Hemozoína Sintética**

Ambas as amostras de hemozoína sintética utilizadas neste trabalho foram sintetizadas pelo método de Slater, com algumas modificações.

A hemozoína sintética cedida pela Professora Doutora Cevayir Coban foi sintetizada segundo descrito na referência número <sup>111</sup>.

A síntese da hemozoína produzida no Instituto de Medicina Molecular foi realizada através da dissolução de 475 mg de cloreto de hemina em NaOH (0,1M). Após a dissolução da hemina, procedeu-se à precipitação da porfirina por adição de 35 mL de ácido acético glacial. A cristalização do precipitado foi promovida pelo aquecimento contínuo (*over night*) a 80°C, com agitação. De forma a remover o heme não cristalizado, procedeu-se a três lavagens, durante três horas, com bicarbonato de sódio (100 mM) a pH 9,1. Entre cada lavagem a solução foi centrifugada a 4000 RPM durante 15 minutos. No final das lavagens incubou-se *over night* com água ultra pura (Gibco, Invitrogen). Após esta incubação a solução foi lavada três vezes com água ultra pura. Por fim ressuspendeu-se a hemozoína produzida em 5 volumes de água ultra pura e armazenou-se a 4°C. A hemozoína produzida foi quantificada e submetida a testes de pureza e qualidade.

### **Anexo iii - Metodologia de avaliação da contaminação por bactérias do género *Mycoplasma***

A hemozoína a testar foi incubada *over night* em RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen), de forma a permitir o desenvolvimento de bactérias do género *Mycoplasma*, possíveis contaminantes da amostra.

A hemozoína incubada foi lavada com tampão de lavagem por centrifugação a 13 000 RPM durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet guardado a -20°C. As amostras foram posteriormente ressuspensas em 50 µL de solução A e B, (numa proporção 1:1) e incubadas durante 1 hora a 60°C e durante 10 minutos a 90°C.

A reacção de amplificação foi realizada num volume final de 25 µL contendo: 12,5 µL de MasterMix 2X (Promega, California, EUA), 1 µL de cada iniciador de reacção (0,4 µM), 7,5 µL de água ultra pura estéril e 3 µL da amostra a testar.

Após a realização da reacção de PCR, a presença de ADN bacteriano foi investigada recorrendo a electroforese em gel de agarose (1%). O gel foi submetido a uma corrente de 90V durante 1 hora. A revelação do gel é feita através da incorporação do reagente Gelred (1:20 000) (Biotium, California, EUA), um agente intrecalante, fluorescente quando exposto a radiação ultra-violeta.

**Tabela 5 Constituintes das soluções utilizadas**

| <b>Solução A</b>         | <b>Solução B</b>         |
|--------------------------|--------------------------|
| Tris-HCl pH8,3 10 mM     | Tris-HCl pH8,3 10 mM     |
| KCl 100 mM               | Tween 20 (1 %)           |
| MgCl <sub>2</sub> 2,5 mM | MgCl <sub>2</sub> 2,5 mM |
|                          | Triton X-100 (1 %)       |
|                          | Proteinase K 120 µg/mL   |

#### **Anexo iv - Consentimento informado**

Participação no estudo: “A imunomodulação do pigmento malárico (hemozoína) aumenta a susceptibilidade para infecções bacterianas disseminadas?”

O presente estudo tem como objectivo o estudo do pigmento malárico. Este pigmento é formado durante uma infecção por malária, doença que é transmitida por um mosquito e que no humano infecta os glóbulos vermelhos. O nosso interesse no estudo deste pigmento está no facto de se suspeitar que o pigmento está envolvido em interacções com o hospedeiro e que no longo termo poderá causar imunodepressão, ou seja, torna-se mais provável que um doente com malária seja infectado com outras doenças.

Assim amostras de sangue de dadores saudáveis irão ser usadas para obter glóbulos brancos (PBMC). Estes PBMC vão depois ser incubados com pigmento malárico, a crescer em cultura. Após incubação determina-se a expressão de marcadores na superfície dos PBMC, que são indicadores de como estas células respondem durante uma infecção.

Gostaria de pedir o seu consentimento e colaboração no estudo acima referido a realizar no Instituto de Medicina Molecular.

Para tal gostaria que permitisse a realização da colheita de uma amostra de sangue (aproximadamente 10-12ml: mais ou menos o que é retirado numa análise de rotina).

Toda a informação será mantida confidencial e não serão realizadas quaisquer análises de natureza clínica às amostras colhidas.

O consentimento pode ser retirado a qualquer altura pelo dador, sem prejuízos para o mesmo. O voluntário pode contactar o IP (Prof. Dr Thomas Hanscheid, [t.hanscheid@fm.ul.pt](mailto:t.hanscheid@fm.ul.pt); Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Hospital de Santa Maria, Avenida Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa; Telefone: 217999458) para quaisquer esclarecimentos ou para que lhe sejam disponibilizados os resultados do estudo em questão.

## **Consentimento Informado**

Participação no estudo: “A imunomodulação do pigmento malárico (hemozoína) aumenta a susceptibilidade para infecções bacterianas disseminadas?”

O abaixo-assinado declara que se encontra consciente da finalidade do estudo; que toda a informação pessoal será mantida confidencial; que pode solicitar os resultados do estudo bem como que todas as suas dúvidas lhe foram esclarecidas.

Mais declara que está informado acerca do carácter voluntário da sua participação, pelo que subscreve a presente autorização de participação no estudo.

O consentimento pode ser retirado a qualquer altura pelo dador, sem prejuízos para o mesmo. O voluntário pode contactar o IP (Prof. Dr Thomas Hanscheid, [t.hanscheid@fm.ul.pt](mailto:t.hanscheid@fm.ul.pt); Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Hospital de Santa Maria, Avenida Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa; Telefone: 217999458) para quaisquer esclarecimentos ou para que lhe sejam disponibilizados os resultados do estudo em questão.

Lisboa, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

---

(assinatura legível)

**Anexo v – Preparação do meio completo de cultura de *Plasmodium falciparum***

O Albumax foi preparado através da dissolução dos seguintes reagentes em água do tipo I.

**Tabela 6 Lista de reagentes utilizados na preparação de Albumax**

| <b>Reagente</b>                                      | <b>Quantidade</b> | <b>Marca</b>                       |
|--|-------------------|------------------------------------|
| AlbuMAX II®  | 25 g              | Gibco, Invitrogen, Madrid, Espanha |
| RPMI-1640 (com L-glutamina, sem NaHCO <sub>3</sub> ) | 5,2 g             | Gibco, Invitrogen, Madrid, Espanha |
| HEPES  | 2,98 g            | VWR, Carnaxide, Portugal           |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 1,67 g            | Sigma, Sintra, Portugal            |
| Glucose  | 1,0 g             | Sigma, Sintra, Portugal            |
| Gentamicina (a 50 mg/mL)                             | 500 µL            | Gibco, Invitrogen, Madrid, Espanha |
| Hipoxantina *  | 0,1 g             | Sigma, Sintra, Portugal            |

\* A hipoxantina foi previamente preparada através da adição NaOH, gota a gota, até a dissolução completa

Após a dissolução dos reagentes a cima mencionados ajustou-se o pH da solução a 7,2-7,4 e fez-se até ao volume de 500 mL, com água tipo II. A solução foi posteriormente filtrada com um filtro estéril de 0,22 µm e guardada a -20° C em alíquotas de 50 mL.

**Meio completo para a cultura de malária (MCM, do inglês *Malaria Complete parasite Medium*)**

Adiciona-se a 500 mL de RPMI-1640 cinquenta mL de albumax, cinco mL de L-glutamina (200 mM), 12 mL de HEPES e 500 µL de gentamicina (50 mg/mL).

## Anexo vi – Análise quantitativa e qualitativa e das diferentes hemozoínas utilizadas

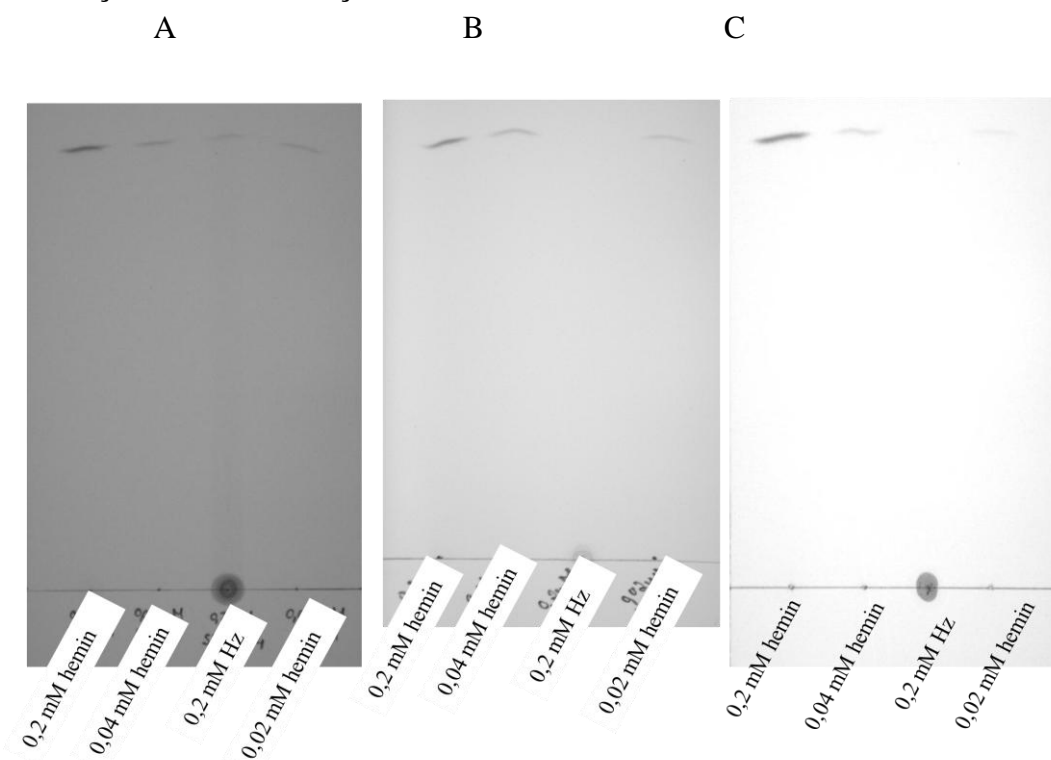
### Cálculo da concentração de Hemozoína

**Tabela 7: Densidades ópticas e factores de diluição utilizados para determinar a concentração de hemozoína**

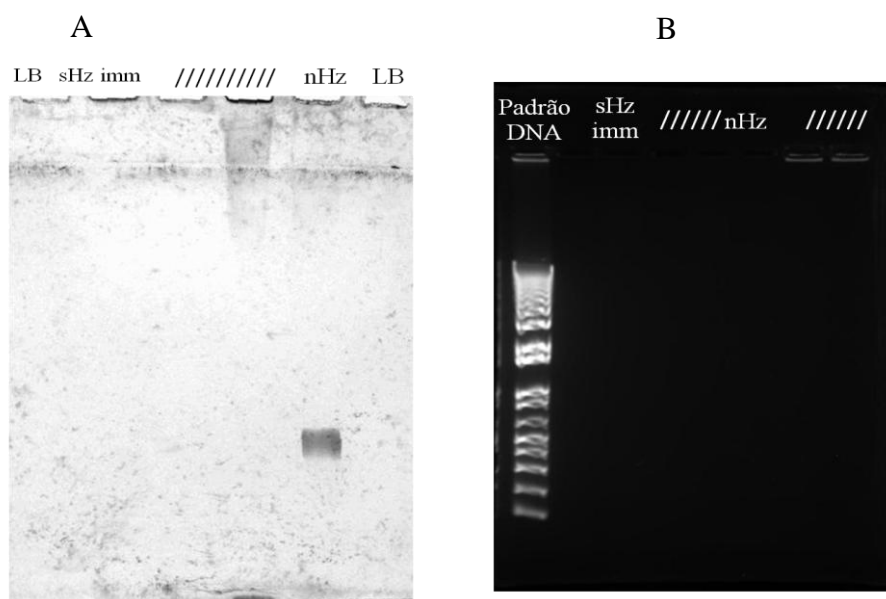
| Tipo de Hemozoína                      | Densidade óptica (OD) do branco | Densidade óptica (OD) do calibrador | Densidade óptica (OD) da amostra | Factor de diluição (n) | Concentração (mM) |
|--|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------|-------------------|
| Hemozoína Sintética (produzida no IMM) | 0,074                           | 0,518                               | 0,211                            | 18,54                  | 3,5               |
| Hemozoína sintética produzida no Japão | 0,074                           | 0,518                               | 0,450                            | 17,0                   | 7,8               |
| Hemozoína Nativa                       | 0,035                           | 0,57                                | 0,16                             | 100,0                  | 1,5               |

$$\text{concentração de hemozoína } (\mu\text{M}) = \frac{OD \text{ da amostra} - OD \text{ branco}}{OD \text{ Calibrado} - OD \text{ branco}} \times 62,5 \times n$$

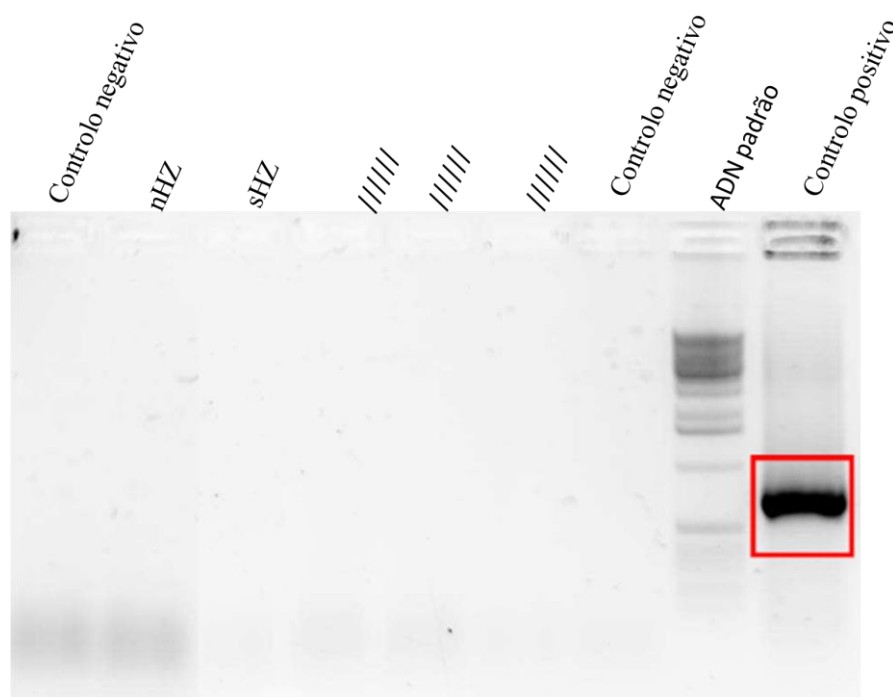
### Avaliação da contaminação com heme



**Figura 28: Cromatogramas de avaliação da contaminação das diferentes hemozoínas com heme.** Cromatogramas de cromatografia em camada fina. Painel A – hemozoína sintética produzida no IMM. Painel B - hemozoína nativa. Painel C –hemozoína sintética produzida no Japão.



**Figura 29: Avaliação da contaminação com proteínas e ADN.** Painei A - Gel de poliacrilamida utilizado para avaliar a contaminação de hemozoína sintética produzida no IMM (sHzimm) e e hemozoína nativa (nHz). No primeiro e último poço encontra-se *loading buffer* (LB). Painei B – Gel de agarose utilizado para avaliar a contaminação de contaminação com ADN de hemozoína sintética produzida no IMM (sHzimm) e hemozoína nativa (nHz)



**Figura 30: Avaliação de contaminação das diferentes hemozoínas com bactérias do género *Mycoplasma*.** Gel de agarose a 1% corado com Gel-Red (1/20.000) utilizado para avaliar a contaminação de hemozoína nativa (nHz) e sintética, produzida no IMM, (sHz) com bactérias do género *Mycoplasma*. No interior do quadrado vermelho encontra-se o fragmente de ADN que se obteria caso houvesse contaminação.



**Anexo vii – Unidades formadoras de colónias de *Salmonella enterica* serótipo Typhimurium obtidas para cada tempo de incubação com hemozoína e respectivos controlos.**

**Tabela 8** Unidades formadoras de colónias de *Salmonella enterica* serótipo Typhimurium ensaio bactericida com monócitos pré-incubados com ou sem hemozoína.

|   | CFUs/ mL obtidas após o ensaio bactericida<br>(15 minutos de incubação com monócitos) |      | CFUs/ mL obtidas após o ensaio bactericida<br>(60 minutos de incubação com monócitos) |                |
|---|---|------|---|----------------|
| <b>Monócitos pré-incubados durante 6 horas</b>  | <b>Nd</b>   | 650  | <b>Nd</b>   | 2850           |
|   |   | 460  |   | 2980           |
|   |   | 310  |   | 4000           |
|   | <b>Beads</b>  | 540  | <b>Beads</b>  | 4190           |
|   |   | 390  |   | 4190           |
|   |   | 1350 |   | 3630           |
|   | <b>Hz</b>   | 3020 | <b>Hz</b>   | Incontável     |
|   |   | 2330 |   |                |
|   |   | 4848 |   |                |
| <b>Monócitos pré-incubados durante 24 horas</b> | <b>Nd</b>   | 150  | <b>Nd</b>   | 300            |
|   |   | 290  |   | 259            |
|   |   | 250  |   | 473            |
|   | <b>Beads</b>  | 210  | <b>Beads</b>  | 111            |
|   |   | 100  |   | Sem informação |
|   |   | 170  |   | Sem informação |
|   | <b>Hz</b>   | 3710 | <b>Hz</b>   | Incontável     |
|   |   | 3590 |   |                |
|   |   | 4040 |   |                |

Monócitos pré-incubados durante seis ou 24 horas sem nada (Nd), com *beads* de Látex (*beads*) ou com 50 µM de hemozoína sintética (produzida no Japão)

**Aumento da sobrevivência de *Salmonella* no ensaio bactericida (15 minutos) onde os monócitos foram pré-incubados com hemozoína**

Média de CFU's de *Salmonella* incubada com os monócitos controlo durante:

- 6 horas - 473
- 24 horas – 230

Média de CFU's de *Salmonella* incubada com os monócitos pré-incubado com hemozoína durante:

- 6 horas - 3410
- 24 horas – 3780

$$\text{Aumento após 6 horas: } \frac{3410}{472} = 7,2$$

$$\text{Aumento após 24 horas: } \frac{3780}{230} = 16,4$$